

14. Pandiri A. R., Mays J. K., Fadly A. M. Influence of strain, dose, of virus, and age of inoculation on subgroup J avian leucosis virus persistence, antibody response and oncogenicity in commercial meat-type chickens. *Avian Dis.* 2007; 51: 725—732.
15. Pandir A. R., Gimeno I. M., Reed W. M. et al. Distribution of viral antigen gp85 and provirus in various tissues from commercial meat-type and experimental White Leghorn Line 0 chickens with different subgroup J avian leucosis infection profiles. *Avian Patol.* 2008; 37 (1): 7—13.
16. Payne L. N., Brown S. R., Bumstead N. et al. A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 801—807.
17. Payne L. N., Howes K., Smith L. M., Venugopal K. Current status of diagnosis, epidemiology and control of ALV-J. In: Fadly A. M. et al. eds. *Avian Tumor Viruses Symposium*. Reno, NV: American Association of Avian Pathologists. 1997; 58—62.
18. Silva R. F., Fadly A. M., Hunt H. D. Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leucosis viruses obtained from different farms in the U. S. *Virology.* 2000; 272: 106—111.
19. Silva R. F., Fadly A. M. Evolution of ALV-J strains. In: Kaleta E. F. et al. eds., *International Symposium on ALV-J and Other Avian Retroviruses*. Rauschholzhausen, Germany: World Veterinary Poultry Association, 2000:23—31.
20. Smith E. J., Fadly A. M., Crittenden L. B. Observations on an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against avian leucosis/sarcoma viruses. *Avian Dis.* 1986; 30: 488—493.
21. Smith E. J., Salter D. W., Silva R. F., Crittenden L. B. Selective shedding and congenital transmission of endogenous avian leucosis viruses. *J. Virol.* 1986; 60: 1050—1054.
22. Thapa B. R., Omar A. R., Arshad S. S., Hair-Bejo M. Detection of avian leucosis virus subgroup J in chicken flocks from Malaysia and their molecular characterization. *Avian Pathol.* 2004; 33 (3): 359—363.
23. Witter R. L., Lee L. F., W. Okazaki W. Expression of endogenous (gs, chick helper factor, Rous-associated virus-O) and exogenous avian RNA tumor viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 1975; 55: 215—218.
24. Witter R. L., Bacon L. D., Hunt H. D. et al. Avian leucosis virus subgroup J infection profiles in broiler breeder chickens: association with virus transmission to progeny. *Avian Dis.* 2000; 44: 913—931.
25. Zavala G., Cheng S., Jackwood M. W. Molecular epidemiology of avian leucosis virus subgroup J and evolutionary history of its 3' untranslated region. *Avian Dis.* 2007; 51 (4): 942—953.

Поступила 22.03.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 616.98:578.832.1]-092.9

А. В. Зайковская¹, К. А. Шаршов¹, Е. А. Шерстков¹, А. К. Юрлов², А. М. Шестопалов¹

Экспериментальная инфекция сизой чайки (*Larus canus*), вызванная вирусом гриппа А/Н5N1

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская область, пос. Кольцово; ²Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

Штамм вируса гриппа A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1), выделенный от клинически здоровой сизой чайки (*Larus canus*), при экспериментальном инфицировании не вызывает гибель своего естественного хозяина (сизая чайка). Показано, что вирус способен к эффективной репликации в тканях легких, селезенки, верхних дыхательных путей, в клетках слизистых оболочек кишечника сизой чайки с последующим выделением во внешнюю среду со слизистыми выделениями из клоаки и глотки в течение 2 нед. Обсуждается потенциальная роль этого вида птиц в циркуляции вируса гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа H5-субтипа, экспериментальная инфекция, сизая чайка

Experimental infection caused by influenza A (H5N1) virus in common gull (*Larus canus*)

A. V. Zaykovskaya¹, K. A. Sharshov¹, E. A. Sherstkov¹, A. K. Yurlov², A. M. Shestopalov²

¹Vektor State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region; ²Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

The influenza A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1) virus strain isolated from a clinically healthy common gull (*Larus canus*) caused no death of its natural host (a common gull). The virus was shown to be capable for effective replication in the tissues of the lung, spleen, and upper respiratory tract and in the intestinal mucosal cells of the common gull with further environmental virus liberation elimination along with mucinous discharges from the cloaca and fauces for 2 weeks. The potential role of this bird species in the circulation of influenza virus is discussed.

Key words: influenza H5-subtype virus, experimental infection, common gull (*Larus canus*)

Природным резервуаром вируса гриппа являются различные перелетные птицы, принадлежащие к отрядам гусеобразных (*Anseriformes*) и ржанкообразных (*Charadriiformes*) [16]. Они широко распространены во всем мире и в основном представлены видами, мигрирующими на далекие расстояния [15].

В 2005 г. была зарегистрирована эпизоотия гриппа птиц на территории Новосибирской области среди разных видов домашних и диких птиц. Результаты филогене-

нетического анализа указывают на то, что вирус гриппа был занесен с территории Китая, по-видимому, дикими перелетными птицами в период весенней миграции [3, 13]. В июле 2006 г. от сизой чайки, не имеющей видимых признаков болезни, был выделен вирус A/common gull/Chany/P/2006 H5N1-субтипа. Генетически вирус охарактеризован как высокопатогенный для кур, однако в эксперименте он показал более низкую степень патогенности для кур по сравнению с другими штаммами

Контактная информация:

Зайковская Анна Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.; e-mail:zaykovskaya@ngs.ru

вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенными на территории Западной Сибири (показатель внутривенного теста на патогенность был равен 1,7). Таким образом, обладая патогенным потенциалом для кур, вирус не вызывал видимого клинического проявления болезни у своего естественного хозяина в природных условиях [6, 12].

Дикие птицы относительно устойчивы к вирусу гриппа птиц [2]. Было показано, что некоторые виды диких уток (представителей отряда гусеобразных) могут быть носителями вируса гриппа H5-субтипа до 3 нед, выделяя вирус в высоких концентрациях с фекалиями, при этом в большинстве случаев видимых признаков болезни не наблюдается [14]. Роль представителей отряда ржанкообразных в поддержании циркуляции патогенных вариантов вируса гриппа H5-субтипа в природе к настоящему времени изучена недостаточно.

Целью исследований явилась оценка восприимчивости диких птиц вида сизая чайка (*Larus canus*) к штамму вируса гриппа A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1) при экспериментальном инфицировании.

Материалы и методы

Животные. В эксперименте были использованы птицы вида сизая чайка (*Larus canus*) 6-недельного возраста. Яйца птиц были собраны из гнезд на колониальных поселениях сизых чаек. Инкубация яиц и выращивание молодняка были проведены на биологическом стационаре Института систематики и экологии животных СО РАН. Работу с инфицированными животными выполняли в условиях инфекционного вивария с уровнем биобезопасности BSL-2 с соблюдением рекомендаций, изложенных в работе [4].

Вирус: A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1) в виде аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) (6-й пассаж на РКЭ) с титром $10^{8,5}$ ЭИД₅₀/мл.

Инфицирование проводили дозой вируса 10^6 ЭИД₅₀/мл в объеме 1 см³ на птицу путем нанесения на слизистые оболочки носовых ходов, конъюнктивы и ротовой полости. В течение 14 дней после инфицирования у каждой птицы ежедневно брали мазки из клоаки и глотки. На 2, 4, 6, 8, 10 и 14-е сутки прибегали к эвтаназии одной или двух птиц для определения наличия вируса в тканях органов.

Титры вируса в мазках из клоаки и глотки определяли следующими методами.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Для выделения РНК использовали набор «SV Total RNA Isolation system» («Promega», США), для ПЦР в реальном времени — набор «Амплиценс Influenza virus A H5N1-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителей.

Инфицирование РКЭ. Готовили 2 последовательных 10-кратных разведения исследуемого материала. Для инфицирования использовали РКЭ 9-дневного возраста с последующим подтверждением наличия вируса в аллантоисной жидкости РКЭ при помощи реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1% суспензии эритроцитов петуха [17].

Статистический анализ. Значение 50% эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина [1].

Результаты

Восприимчивость к вирусу при экспериментальном инфицировании птиц вида сизая чайка (*Larus canus*), которые являются естественными хозяевами штамма вируса гриппа A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1), оценивали по способности вируса эффективно продуцироваться в организме подопытных птиц, вызывая заболевание с

Результаты исследования мазков из глотки и клоаки птиц при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени

| Сутки п. и. | Количество птиц (голов) | Результат ОТ-ПЦР в реальном времени | | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | | мазки из глотки | | мазки из клоаки | |
| | | +/- | % положительных проб | +/- | % положительных проб |
| 1 | 9 | 9/9 | 100 | 8/9 | 88,9 |
| 2 | 9 | 9/9 | 100 | 8/9 | 88,9 |
| 3 | 8 | 8/8 | 100 | 7/8 | 87,5 |
| 4 | 8 | 5/8 | 62,5 | 7/8 | 87,5 |
| 5 | 6 | 3/6 | 50 | 5/6 | 83,3 |
| 6 | 4 | 2/4 | 50 | 3/4 | 75 |
| 8 | 3 | 2/3 | 66,7 | 2/3 | 66,7 |
| 10 | 3 | 1/3 | 33,3 | 1/3 | 33,3 |
| 12 | 2 | 2/2 | 100 | 2/2 | 100 |
| 14 | 2 | 2/2 | 100 | 2/2 | 100 |

Примечание. п. и. — после инфицирования; +/- — количество положительных проб от общего количества.

выделением вируса во внешнюю среду и накоплением в тканях внутренних органов.

Было отмечено, что вирус способен вызывать болезнь у инфицированных птиц, которая проявлялась конъюнктивитами, диареей, гиперемией глотки. Неврологические симптомы, за исключением снижения аппетита и активности, не отмечены. Случаи специфической гибели птиц в течение всего периода наблюдения не зарегистрированы.

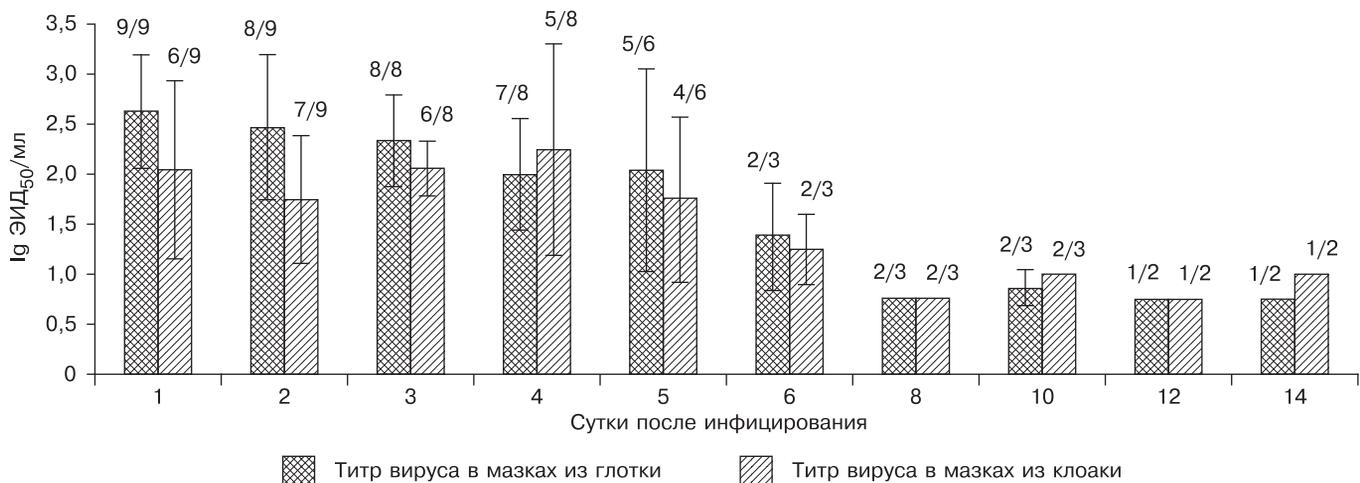
Выделение вируса во внешнюю среду со слизистыми выделениями клоаки и глотки в ОТ-ПЦР в реальном времени регистрировали в течение всего периода наблюдения, который в эксперименте составил 2 нед (см. таблицу).

В течение первых 3 сут после инфицирования процент птиц, выделяющих вирус со слизью из глотки, составил 100, из клоаки — 88,9. С 4-х по 6-е сутки этот показатель для мазков из клоаки превышал таковой для мазков из глотки. Однако в целом наблюдается общая тенденция к уменьшению этих показателей до 10-х суток. Обе особи, которые остались в эксперименте после 12 сут, выделяли вирус и из глотки, и из клоаки. На протяжении эксперимента вирус был выявлен у всех подопытных птиц.

Наибольшие титры вируса в мазках из глотки были зарегистрированы в 1-е сутки, а из клоаки — на 4-е сутки после инфицирования. Титр вируса в мазках из глотки постепенно снижается в течение всего периода наблюдения, а в мазках из клоаки наблюдается увеличение концентрации вируса к 4-му дню с последующим уменьшением. Начиная с 8-го дня титры вируса в мазках как из глотки, так и из клоаки не превышали $1,0 \lg$ ЭИД₅₀/мл.

При анализе количества птиц, выделяющих инфекционный вирус со слизистыми выделениями из клоаки и глотки (см. рисунок), можно отметить, что до 5-х суток после инфицирования процент положительных проб мазков из глотки выше аналогичного значения для клоакальных проб. Начиная с 6-х суток значения этих показателей равны. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее активно птицы выделяют инфекционный вирус в течение первых 5 сут после инфицирования.

Определение вируса в тканях внутренних органов подопытных птиц без определения его количественных показателей было проведено путем инфицирования РКЭ. Вирус гриппа был диагностирован в ткани легких на 2, 4 и 6-е сутки, селезенки — на 4-е и 6-е сутки и кишечника — на 14-е сутки после инфицирования.



Титры вируса в мазках из глотки и клоаки.

Титры вируса выражены в lg ЭИД₅₀ в 1 мл исследуемого образца в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение, ЭИД₅₀ — 50% эмбриональная инфекционная доза. Над соответствующими столбцами указано отношение количества положительных проб к количеству исследованных.

Обсуждение

Представители отряда ржанкообразных (*Charadriiformes*), в частности семейства чайковых (*Laridae*), играют важную роль в циркуляции вируса гриппа А. Для территории Евразии дикие птицы вида сизая чайка являются массовым, широко распространенным видом диких птиц, способным совершать длительные миграции и имеющим при этом тесный контакт со многими видами диких и домашних птиц.

Восприимчивость птиц семейства чайковых к вирусу гриппа А показана в ряде работ [2, 8—11]. В данной работе представлены результаты моделирования приближенного к естественному инфекционного процесса, вызванного вирусом A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1). Для моделирования гриппозной инфекции нами были использованы дикие птицы вида сизая чайка, которые являются природным хозяином штамма вируса гриппа A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1). Инфицирование проведено, наиболее приближенным к естественному для диких птиц водного и околоводного комплекса путем нанесения вируса на слизистые оболочки носовых ходов, конъюнктивы и ротовой полости.

Было установлено, что вирус A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1) при экспериментальном инфицировании вызывает у птиц вида сизая чайка (*Larus canus*) нелетальную инфекцию, которая проявляется воспалительными процессами негнойного характера в местах внедрения вируса, временным общим угнетением. При этом инфицированные птицы не теряют способность к полетам и, следовательно, к механическому распространению вируса.

Штамм вируса гриппа A/common gull/Chany/P/2006 (H5N1) при экспериментальном заражении сизых чаек способен к эффективной репродукции в тканях верхних дыхательных путей, легких, селезенки, в клетках слизистых оболочек кишечника с последующим выделением во внешнюю среду. Инфицированные птицы выделяли инфекционный вирус из клоаки и глотки в течение 2 нед, т. е. на протяжении всего периода наблюдения. Вирус гриппа был выявлен у всех подопытных птиц, что говорит о высокой степени восприимчивости этого вида к исследуемому штамму вируса гриппа.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности активного участия птиц вида сизая чайка в распространении высокопатогенного вируса гриппа во время миграций.

Случаи заболевания гриппом H5N1 регулярно регистрируются у животных, в частности у птиц семейства чайковых (*Laridae*), что делает актуальным дальнейшее изучение роли чаек в экологии вируса гриппа А.

Работа была поддержана грантами МНТЦ (BIO-INDUSTRY INITIATIVE, USA, ISTC 3436), АФГИР RUB2-2991-NO-10, ФЦП Госконтрактом 16.740.11.0179, ФЦНТП Госконтрактом 02.740.11.0709 и грантом для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962; 85—92.
2. Львов Д. К., Ильичев В. Д. Миграция птиц и перенос возбудителей инфекции. М., 1979.
3. Онищенко Г. Г., Шестопалов А. М., Терновой В. А. и др. Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1-вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-Восточной Азии в 2003—2005 гг. Докл. Акад. наук. 2006; 2 (406). 1—3.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон, 1996.
5. Ходков Г. И. Миграции и сезонные размещения чайковых птиц Барабинской низменности по данным кольцевания. Миграции птиц в Азии: Наука. Казахской ССР. 1983; 8. 143—156.
6. Шаршов К. А., Курская О. Г., Зайковская А. В. и др. Характеристика высокопатогенного штамма вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенного от сизой чайки (*Larus canus*). Журн. микробиол. 2010; 1: 29—32.
7. Easterday B. C., Hinshaw V. S., Halvorson D. A. et al. Influenza. Diseases of poultry. Iowa State University Press, Ames. 1997; 583—605.
8. Fouchier R. A., Munster V., Wallensten A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol. 2005; 79 (5): 2814—2822.
9. Makarova N. V., Kaverin N. V., Krauss S. et al. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. J. Gen. Virol. 1999. 80 (12): 3167—3171.
10. Normil D. Avian influenza. Potentially more lethal variant hits migratory birds in China. Science. 2005; 309 (5732).
11. Perkins L. E., Swayne D. E. Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza viruses. Avian Dis. 2002; 46 (4): 877—885.
12. Sharshov K., Romanovskaya A., Uzhachenko R. et al. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia. Arch. Virol. 2011; 155 (7): 1145—1150.
13. Shestopalov A. M., Durimanov A. G., Evseenko V. A. et al. H5N1 influenza virus, domestic birds, Western Siberia, Russia. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12 (7): 1167—1169.

14. Sturm-Ramirez K. M., Hulse-Post D. J., Govorkova E. A. et al. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia. *J. Virol.* 2005; 79 (17). 1269—1279.
15. Veen J., Yurlov A. K., Delany S. N. et al. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds. Wetlands International, Wageningen, The Netherlands, 2005; 60.

16. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 19; 56: P. 152—179.
17. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization (WHO), 2002.

Поступила 03.08.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 576.3.08:008

*Р. Я. Подчерняева¹, И. А. Сутина¹, Г. Р. Михайлова¹, О. А. Лопатина¹, И. И. Бобринецкий²,
Р. А. Морозов², А. С. Селезнев²*

Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России;
²ФГБОУ ВПО Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

Данное исследование показало, что 3 изученных образца углеродных нанотрубок отечественного производства, закреплённые на поверхности подложки, не обладают токсичными свойствами и могут быть использованы для культивирования клеток. Создано биосовместимое электропроводящее покрытие на основе углеродных нанотрубок и бычьего сывороточного альбумина и продемонстрирована его эффективность при культивировании клеток *in vitro*. Для электрической стимуляции клеток разработано устройство для локального подведения электрического потенциала к клеткам через наноразмерные электроды. Приведены результаты культивирования фибробластов эмбриона человека в импульсном электрическом поле на проводящих нанокompозитных подложках. Показано увеличение пролиферативной активности клеток на 26% при потенциалах до 100 мВ.

Ключевые слова: *нанокompозитные подложки, углеродные нанотрубки, перевиваемые клетки фибробластов эмбриона человека, пролиферация*

Cultivation of Continuous Cell Lines on the Substrate of Carbon Nanotubes and the Effect of Electric Stimulation on Cell Proliferation

R. Y. Podchernyaeva¹, I. A. Suetina¹, G. R. Michailova¹, O. A. Lopatina¹, I. I. Bobrinetskiy², R. A. Morozov², and A. S. Seleznev²

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;
² National Research University of Electronic Technology, Zelenograd, Moscow, Russia

It was demonstrated that the three studied samples of carbon nanotubes of domestic production fixed on the substrate surface did not have toxic effect and could be used for cell cultivation. A biocompatible conductive coating based on carbon nanotubes and bovine serum albumin was developed. The efficacy of the coating for growing *in vitro* cell cultures was tested. A device was developed for electric stimulation of the cells. Local electric potential was applied to the cells using nanoscale electrodes. The results of human embryonic fibroblast cultivation in a pulsed electric field on conductive nanocomposite substrates were presented. An 26% increase in the proliferative activity of cells was observed at potentials up to 100 mV.

Key words: *nanocomposite substrates, carbon nanotubes, transplanted cells, human embryonic fibroblasts, proliferation*

Перспективность нанотехнологии для медицины, биологии и биоинженерии требует изучения ее разработок на клеточном уровне. Углеродные нанотрубки, обладая уникальными электронными свойствами, высокой механической прочностью, высокой гибкостью и высокой удельной поверхностью, являются одним из таких перспективных продуктов нанотехнологии [6, 10]. Имея структуру, геометрически близкую к основному белку соединительной ткани животных — коллагену, углеродные нанотрубки создают соответствующее микроокружение клеток, обеспечивающее их пролиферацию и дифференциацию [8]. С помощью углеродных нанотрубок также можно достичь направленного роста клеток [6—8]. Так, в ряде работ, посвященных созданию новых биосовместимых композитных материалов для биоинженерии, регенерации хрящевых тканей, исследованию

роста фибробластов и применению в нейрохирургии, показано, что дополнительное подведение электрического сигнала к клеткам приводит к увеличению их пролиферативной активности и способствует пространственной организации тканей [4, 9, 11, 12]. Поэтому существенным вопросом в дальнейших разработках в области интеграции углеродных нанотрубок и культур тканей является повышение биосовместимости нанотрубок, в частности за счет создания композитов на основе белковых матриц [5, 9] и изучения влияния электростимуляции на рост и развитие клеток на проводящих подложках из нанотрубок.

Объяснение физических механизмов, регулирующих адгезию и ориентацию клеток в электрическом поле на трехмерной подложке, позволит развить новые подходы к управлению культивированием клеток.

Контактная информация:

Подчерняева Раиса Яковлевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. культур тканей; e-mail: cell@rambler.ru