

тетрамер нейраминидазы, что может надолго отсрочить появление к ним резистентности. Схема синтеза этих производных адамантана проста и содержит синтетически и экономически доступные соединения, что делает их перспективными соединениями для создания фармацевтического препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Luo W., Mani R., Hong M. Side-chain conformation of the M2 transmembrane peptide proton channel of influenza A virus from 19 F solid-state NMR. *J. Phys. Chem.* 2007; 111: 10825–32.
2. Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M. Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: The role of Ser31 in amantadine binding. *J. Mol. Biol.* 2009; 385: 1127–41.
3. Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106 (27): 11425.
4. Hu F., Luo W., Hong M. Mechanisms of proton conduction and gating in influenza M2 proton channels from solid-state NMR. *Science.* 2010; 330 (6003): 505–8.
5. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S.; Burtseva E.I. New adamantane derivatives capable of overcoming the resistance of influenza A (H1N1) pdm2009 and A (H3N2) for “rimantadine”. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153 (2): 233–5.
6. Ленева И.А., Фадеева Н.И., Федякина И.Т., Гуськова Т.А., Христова М.Л., Соколова М.В. и др. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противогриппозного препарата арбидол. *Химико-фармацевтический журнал.* 1994; 28 (9): 4–8.
7. Гуськова Т.А., Николаева И.С., Петерс В.В. Методические указания по изучению противовирусной активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* М.: Ремедиум; 2000: 274–8.
8. Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий. Л.: Медицина; 1981: 130–1.
9. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Производные 1-(1-адамантил)этиламина (ремантадина) и их противовирусная активность. Патент РФ RU 2461544 С1.

10. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Галегов Г.А. Белякова Н.В., Шевченко Е.С., Колобухина Л.В. и др. Чувствительность эпидемических и пандемических штаммов вирусов гриппа к занамивиру (Релензе™) в опытах *in vitro*. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (6): 10–4.

REFERENCES

1. Luo W., Mani R., Hong M. Side-chain conformation of the M2 transmembrane peptide proton channel of influenza A virus from 19 F solid-state NMR. *J. Phys. Chem.* 2007; 111: 10825–32.
2. Cady S.D., Mishanina T.V., Hong M. Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: The role of Ser31 in amantadine binding. *J. Mol. Biol.* 2009; 385: 1127–41.
3. Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106 (27): 11425.
4. Hu F., Luo W., Hong M. Mechanisms of proton conduction and gating in influenza M2 proton channels from solid-state NMR. *Science.* 2010; 330 (6003): 505–8.
5. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S.; Burtseva E.I. New adamantane derivatives capable of overcoming the resistance of influenza A (H1N1) pdm2009 and A (H3N2) for “rimantadine”. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153 (2): 233–5.
6. Leneva I.A., Fadeeva N.I., Fedyakina I.T., Gus'kova T.A., Hristova M.L., Sokolova M.V. et al. The use of virus-specific antigen ELISA indication of learning a new anti-influenza drug arbidol. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal.* 1994; 28 (9): 4–8 (in Russian).
7. Gus'kova T.A., Nikolaeva I.S., Peters V.V. Guidance on the study of the antiviral activity of pharmacological substances. In: *Guidelines for experimental (preclinical) studies of new pharmacological agents.* M.: Remedium; 2000: 274–8 (in Russian).
8. Belyakov V.D., Degtyarev A.A., Ivannikov Yu.G. The quality and effectiveness of anti-epidemic measures. Leningrad: Meditsina; 1981: 130–1 (in Russian).
9. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S.; Burtseva E.I. Patent RF N 2461544; 2011 (in Russian).
10. Lvov D.K., Burtseva E.I., Galegov G.A. Belyakova N.V., Shevchenko E.S., Kolobukhina L.V. et al. Sensitivity of epidemic and pandemic strains of influenza viruses to zanamivir (Relenze™) in experiments *in vitro*. *Voprosy virusologii.* 2010; 55 (6): 10–4 (in Russian).

Поступила 21.03.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 578.832.1.083.24

Д.М. Даниленко, Т.Д. Смирнова, Т.М. Гудкова, А.В. Прокопец, Е.Р. Бильданова, Р.А. Кадырова, А.В. Слита, М.Ю. Еропкин

Сравнительное изучение эффективности использования клеточных линий MDCK и CaCo-2 для выделения вирусов гриппа

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург

Проведено изучение эффективности использования клеточной линии CaCo-2 для выделения вируса гриппа. Показано, что свойства данной клеточной линии могут сильно меняться в зависимости от источника получения и условий культивирования. Инфекционная активность вирусов гриппа на линии CaCo-2 схожа с таковой для линии MDCK. Эффективность изоляции вирусов пандемического гриппа и гриппа В была схожа для обеих линий, но при этом только на CaCo-2 были выделены вирусы гриппа из постмортальных материалов. Сделан вывод о ценности клеточной линии CaCo-2 для вирусологических исследований, в том числе и для выделения вирусов гриппа.

Ключевые слова: культура клеток; MDCK; CaCo-2; выделение вирусов гриппа.

Для корреспонденции:
Даниленко Дарья Михайловна, daria.baibus@gmail.com

Comparative study of MDCK and CaCo-2 cell Lines for influenza virus isolation

D. M. Danilenko, T. D. Smirnova, T. M. Gudkova, A. V. Prokopetz, E. R. Bildanova, R. A. Kadirova, A. V. Slita, M. Yu. Eroпкиn

Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Study of effectiveness of CaCo-2 cell line for influenza virus isolation was carried out. It was shown that the properties of this cell line strongly depended on the source of its origin and cultivation conditions. The infectious activity of the influenza viruses on CaCo-2 cell line was virtually the same as in the MDCK cell line. The rate of the viral isolation was virtually identical for both cell lines tested, but viruses from post-mortem materials were isolated only in CaCo-2 cell line. In general, the CaCo-2 line is believed to be a valuable cell line for virological research, particularly for influenza virus isolation.

Key words: cell cultures; MDCK; CaCo-2; influenza virus isolation.

Введение

Глобальный надзор за гриппом осуществляется Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) с 1947 г., однако высокий уровень изменчивости вирусов гриппа, связанный с быстрым накоплением приобретенных мутаций и селективным отбором наиболее приспособленных штаммов в организме хозяина, делает гриппозную инфекцию одной из наиболее экономически значимых и трудно контролируемых и в настоящее время.

ВОЗ выделение вирусов гриппа признано золотым стандартом в диагностике гриппозной инфекции [1]. Только исследование выделенных вирусов дает возможность следить за их изменчивостью и ежегодно отбирать актуальные штаммы для включения в состав противогриппозных вакцин.

В последние годы произошел практически полный отказ от использования развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) – традиционной модельной системы для выделения вирусов гриппа из проб от людей, так как установлено, что вирусы, выделенные на РКЭ, изменяют свои характеристики. Адаптация вирусов к РКЭ приводит к утрате сайтов гликозилирования поверхностных белков вируса, изменению сродства к рецепторам на клеточной поверхности, изменению антигенных характеристик и появлению мутаций, изменяющих свойства как поверхностных, так и внутренних белков вируса гриппа [2].

В связи с этим значительно возрастает значение клеточных линий в качестве модели, пригодной для выделения и дальнейшего исследования вирусов гриппа.

Неоспоримое лидерство принадлежит клеткам почки собаки линии (MDCK), полученной S. Madin и N. Darby в 1958 г. [3]. Одна из сублиний этих клеток – MDCK II – отличалась по некоторым признакам большей поляризованностью и дифференцировкой по сравнению с сублинией MDCK I и позже обнаружила высокую чувствительность к репродукции вирусов гриппа всех подтипов [4]. На мембране клеток MDCK представлены рецепторы как птичьего α -2,3, так и человеческого α -2,6 типов, что позволяет поддерживать репродукцию вирусов гриппа различного происхождения [5]. Важным фактором при работе с вирусами гриппа является возможность быстро и четко визуализировать результаты вирусной репродукции в световом микроскопе, которые проявляются в развитии цитопатического действия (ЦПД).

Однако не все вирусы гриппа могут эффективно выделяться на клетках MDCK, в связи с чем были созданы генно-инженерные варианты клеток стабильно экспрессирующие человеческую СМР-N-ацетилнейраминат:β-галактозид α -2,6 сиалилтрансферазу – фермент, который приводит к сверхэкспрессии рецепторов человеческого α -2,6 типа на поверхности клеток. В настоящее время созданы следующие клеточные линии: MDCK-SIAT [6], MDCK ST6 Gal 1 [7], MDCK-SIAT7 [8], а также линия клеток почки зеленой мартышки Vero-SIAT1 [9]. Линия MDCK-SIAT с повышенным уровнем рецепторов α -2,6

Gal исследована на эффективность выделения вирусов гриппа из клинических образцов от человека и показала высокий уровень изоляции вирусов, причем последовательность HA1 субъединицы гемагглютинина оставалась генетически стабильной после серии пассажей на клетках MDCK-SIAT1 – признак, который часто изменяется в клетках MDCK или куриных эмбрионах [2].

Важным является тот факт, что линии клеток MDCK не экспрессируют фермент, необходимый для протеолиза вирусного HA на две субъединицы: HA1 и HA2, и для успешной адсорбции и проникновения вируса гриппа в клетку необходимо присутствие экзогенного трипсина в культуральной жидкости.

Одно из наиболее ранних сообщений об использовании клеток аденокарциномы человека, полученной в 1983 г. Pinto и соавт. [10], относится к 1998 г. [11]. С того времени, когда O. Zhirnov и H.D. Klenk [12] обнаружили уникальную особенность клеток CaCo-2 осуществлять протеолиз гемагглютинина вируса гриппа на HA1 и HA2, который происходил в клетках на поздних стадиях внутриклеточного транспорта вирусного HA в транс-сети аппарата Гольджи и участках плазматической мембраны, интерес среди вирусологов к этой клеточной линии значительно возрос. Дифференцированность и поляризация клеток CaCo-2 позволяют вирусу гриппа наиболее эффективно инфицировать клетки и осуществлять выход зрелых вирусных частиц через апикальную поверхность [13]. Кроме того, наличие эндогенной протеазы, позволяющей проводить заражение клеток без добавления трипсина, делает эти клетки незаменимыми при работе с вирусами гриппа. Вирусы гриппа, как и в клетках MDCK, вызывают в клетках CaCo-2 развитие ЦПД и выход HA-вируса в культуральную жидкость. Присутствие на мембране клеток CaCo-2 рецепторов обоих типов – как человеческого α -2,6, так и птичьего α -2,3 – позволяет проводить работу с вирусами различного происхождения.

Цель данной работы – сравнение чувствительности двух сублиний клеток CaCo-2 и клеток MDCK к вирусам гриппа и оценка эффективности выделения вирусов гриппа из клинических образцов в клетках CaCo-2 и MDCK.

Материалы и методы

Вирусы гриппа. В работе использовали следующие вирусы гриппа из коллекции музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: А/Новосибирск/4/04 (H3N2); А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09; А/Свиная/1976/31 (H1N1); А/Брисбен/59/07 (H1N1); А/Брисбен/10/07 (H3N2); А/Курица/Курган/5/05 (H5N1).

Клеточные линии. В работе использовали два варианта клеток ободочной кишки человека (CaCo-2): линию, полученную из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и обозначенную как CaCo-2(1), и линию, полученную из Австрии (Green Hills) и обозначенную как

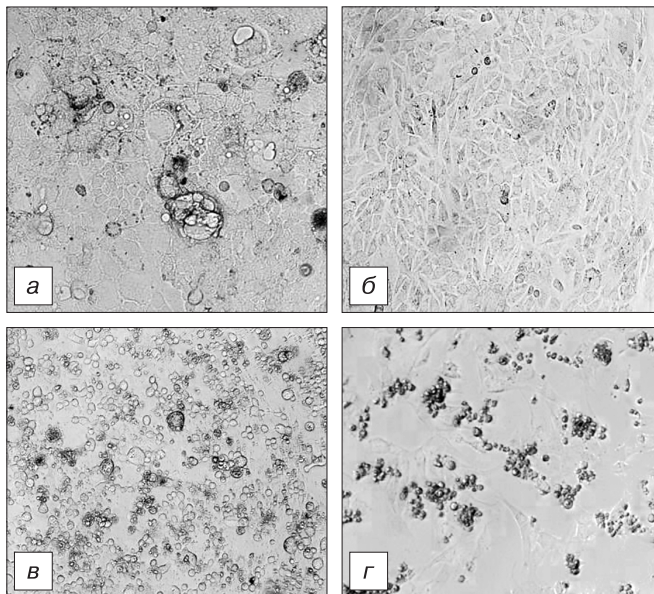


Рис. 1. Морфология клеток карциномы ободочной кишки человека сублиний CaCo-2 (2) (а и в) и CaCo-2 (1) (б и г).

а – монослой клеток CaCo-2 (2) с признаками дифференцировки; б – слабодифференцированный монослой клеток CaCo-2 (1); в – цитопатические изменения в монослое клеток сублинии CaCo-2 (2) и г – в сублинии CaCo-2 (1), вызванные вирусом пандемического гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09. Ув. 200.

CaCo-2(2). Линия CaCo-2(2) (ATCC, США) была любезно предоставлена для исследования А.Ю. Егоровым (Green-Hills, Австрия). Культивирование клеток проводили в питательных средах ЕМЕМ или альфа-МЕМ с добавлением 5% фетальной сыворотки (ф. с.). Клетки почки собаки линии MDCK, полученные из референс-центра ВОЗ (CDC, Атланта, США), были адаптированы к росту на среде ЕМЕМ или альфа-МЕМ с добавлением 2% ф. с. Пересев клеток проводили на 6–7-е сутки с кратностью 1:3 (клетки CaCo-2) и 1:5 (клетки MDCK). Отторжение клеток от поверхности флакона осуществляли с помощью раствора версена с добавлением химопсина.

Материалы для выделения вирусов гриппа. Материалы для выделения вирусов гриппа (назофарингеальные мазки и секционные материалы) получены из больниц и поликлиник Санкт-Петербурга, а также из базовых вирусологических лабораторий Федерального центра по надзору за гриппом.

Выделение вирусов проводили в клеточной культуре MDCK, полученной из референс-центра ВОЗ (CDC, Атланта, США), по методике, приведенной в [1], и клетках CaCo-2(2). Монослой CaCo-2 формировался медленнее, чем монослой MDCK, и работу с CaCo-2 начинали на 2-е сутки после полного формирования монослоя. Выделение на культуре клеток CaCo-2 проводили сходным образом, однако в поддерживающую среду не вносили трипсин.

Реакцию гемагглютинации (РГА) ставили по методике, рекомендованной ВОЗ, с использованием 0,75% взвеси человеческих эритроцитов группы 0 (I) [1].

Определение апоптоза проводили по методике, описанной в [14].

Инфекционную активность вирусов гриппа на культуре клеток изучали согласно методике, рекомендованной ВОЗ и приведенной в [1]. Расчет ТЦИД₅₀ проводили по методу L. Reed и H. Muench [15].

Результаты

Изучение чувствительности двух вариантов клеточной линии CaCo-2. Ранние эксперименты по изучению чувствительности клеток CaCo-2 и MDCK к вирусам гриппа А проводили с использованием варианта CaCo-2(1), который получен из Института цитологии РАН. Клетки, культивируемые на среде ЕМЕМ + 5% ф. с., имели морфологию хорошо дифференцированных, поляризованных клеток. После пересева клетки росли в виде островков, образованных полигональными клетками, и к 4–6-м суткам после пересева островки сливались, образуя плотный монослой с признаками дифференцировки в виде крупных пузырчатых клеток и четко очерченных пустот в монослое. При сравнительном титровании на клетках MDCK (с добавлением трипсина) и CaCo-2(1) (без добавления трипсина) двух вирусов гриппа А/Новосибирск/4/04 (H3N2) и вируса птичьего гриппа А/Курица/Курган/5/05(H5N1) получили одинаковые результаты: 5–5,5 lgТЦД₅₀ для обоих вирусов на обеих клеточных линиях.

Позже клетки CaCo-2(1) перевели на питательную среду альфа-МЕМ + 5% ф. с. С увеличением пассажей на этой среде у клеток CaCo-2(1) стали наблюдать признаки изменения морфологии – клетки становились более расплывчатыми и менее дифференцированными, и только к 5–6-м суткам после пересева монослой клеток уплотнялся и клетки приобретали вид многогранников, при этом пересевались клетки без образования островков (рис. 1). Превращение клеток CaCo-2(1) из высокодифференцированных в менее дифференцированные отразилось на их чувствительности к вирусам гриппа А. Титры всех исследуемых вирусов на клетках CaCo-2(1) были несколько ниже, чем на клетках MDCK и на начальных пассажах на среде ЕМЕМ (табл. 1).

Работу продолжили на другом варианте клеток CaCo-2(2), полученных из Австрии. Данная линия клеток, культивируемая на среде альфа-МЕМ + 5% ф. с., длительное время сохраняет все признаки дифференцировки: полигональная форма клеток от начала до конца пересева, формирование на следующие сутки после пересева островков клеток, сливающихся в плотный монослой с характерными признаками дифференцировки (см. рис. 1).

При проверке чувствительности этой линии клеток к вирусам гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09 и А/Брисбен/10/07 (H3N2) установили идентичные результаты по сравнению с таковыми клеток линии MDCK (5,2–5,7 lgТЦД₅₀ для обоих вирусов).

При заражении как клеток линии CaCo-2(1), так и линии CaCo-2(2) вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09 через 18–20 ч после заражения происходила индукция апоптоза, которая наблюдалась в виде деградации ядерного хроматина после окрашивания клеток красителем Hoechst-33258 (рис. 2).

Таблица 1

Чувствительность (в lgТЦД₅₀/мл) клеточных линий MDCK и CaCo-2(1) к вирусам гриппа птиц, свиней и человека

Клеточная линия/ вирус гриппа	А/Свинья/1976/31 (H1N1)	А/Брисбен/59/07 (H1N1)	А/СПб/5/09 (H1N1pdm-09)	А/Брисбен/10/07 (H3N2)	А/Курица/Курган/5/05 (H5N1)
MDCK	4,5	4,7	5,3	5,6	6,2
CaCo-2	3,7	3,7	4,3	4,4	5,4

Примечание. При титровании вирусов гриппа на клеточной линии CaCo-2 трипсин в среду не вносили.

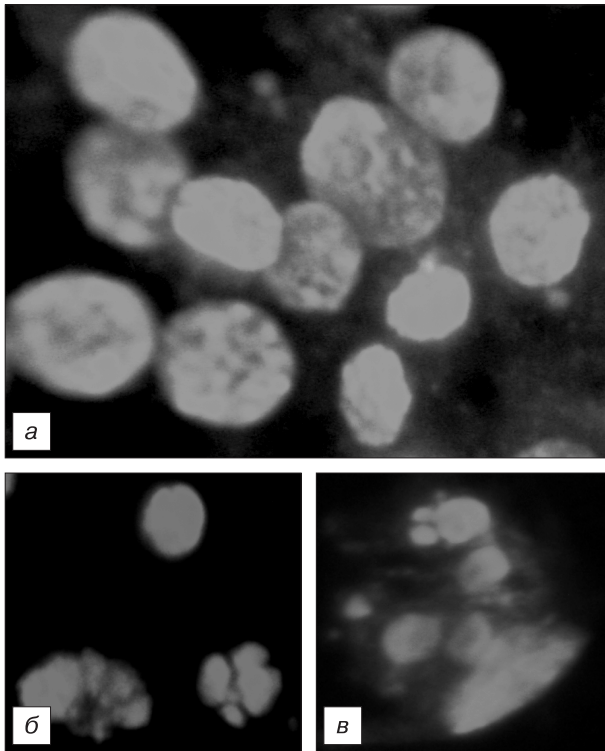


Рис. 2. Состояние ядер клеток сублинии CaCo-2 (2).

Окрашивание красителем Hoechst 33258 (люминесцентная микроскопия). *а* – незараженные клетки; *б, в* – деградация хроматина в результате апоптоза, индуцированного в клетках вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09. Ув. 450, с иммерсией.

Проведенная работа по клонированию клеток CaCo-2 двух линий показала, что все 6 клонов, полученных из линии CaCo-2(1), сохраняли характеристику родительской линии, т. е. были менее дифференцированными, а чувствительность к вирусу гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09 сохранилась на прежнем уровне (на 1 lg ТЦД₅₀ ниже, чем на клетках MDCK). В то же время все 6 клонов, полученных от линии CaCo-2(2), сохранили свою дифференцированность, а 3 клон поддерживали репродукцию вируса гриппа А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09 на два порядка выше, чем в родительской линии и клетках MDCK.

Учитывая полученные результаты, работу по сравнению эффективности выделения вирусов гриппа А и В из клинических материалов провели с использованием линии клеток CaCo-2(2).

Выделение вирусов пандемического гриппа из клинических образцов от больных. Для оценки эффективности выделения вирусов гриппа на клетках MDCK и CaCo-2(2) отобрали 30 проб, в которых присутствие РНК пандемического гриппа А (H1N1)pdm09 было подтверж-

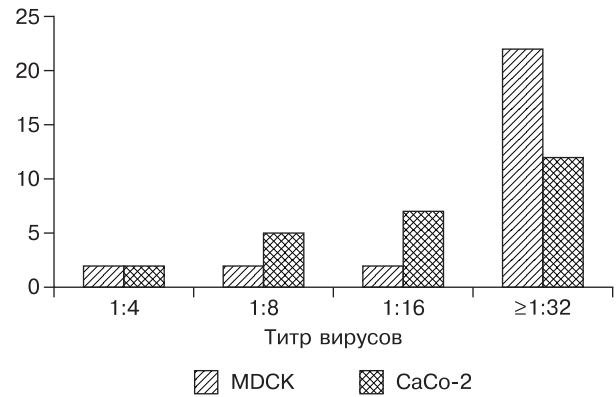


Рис. 3. Распределение титров вирусов гриппа В, выделенных на клеточных линиях MDCK и CaCo-2.

По горизонтали – титр вирусов; по вертикали – количество штаммов.

дено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Получили следующие результаты: использование клеток MDCK позволило выделить 10 вирусов гриппа, а в клетках CaCo-2(2) выделили 9 вирусов. Титры ГА-вирусов, выделенных на обеих клеточных линиях, были низкими (1:4 и ниже), однако последующие 1–2 пассажа увеличивали титры ГА-вирусов на клетках MDCK до 1:16–1:32 и на клетках CaCo-2(2) до 1:8–1:16. Невысокую эффективность выделения вируса H1N1pdm09 можно объяснить прежде всего биологической особенностью циркулирующего вируса, имеющего слабое сродство к клеточным линиям как MDCK, так и особенно к клеткам человеческого происхождения, по сравнению с таковой вирусов эпидемического гриппа подтипов А(H1N1) и А(H3N2). Более того, наличие в пробах вирусной РНК, обнаруженной с помощью ПЦР, еще не свидетельствует о присутствии полноценного инфекционного вируса, способного к репродукции в клетках. Тем не менее результаты выделения вируса пандемического гриппа на клетках CaCo-2(2) были сравнимы с результатами, полученными на клетках MDCK.

Выделение вирусов пандемического гриппа из постмортальных материалов. Выделение вирусов проводили из 30 образцов постмортального материала, в которых обнаружили вирусную РНК методом ПЦР. Результаты выделения в клетках MDCK оказались полностью отрицательными, тогда как при использовании клеток CaCo-2 удалось выделить 4 вируса пандемического гриппа. Титры ГА-вируса были также низкими, но после дополнительных 2 пассажей титры увеличились до 1:8–1:32. Необходимо отметить, что выделение вирусов гриппа из постмортальных образцов редко дает положительные результаты из-за многоступенчатой обработки секционных материалов, которая приводит к значительным потерям инфекционных вирусных частиц.

Таблица 2

Сводные данные по эффективности выделения вирусов гриппа на культурах клеток MDCK и CaCo-2(2)

Клеточная линия	Выделение вирусов гриппа из проб от больных (назофарингеальные мазки), количество штаммов		Титры в РГА с эритроцитами человека при выделении вируса		Выделение вируса гриппа из постмортальных материалов, количество штаммов
	грипп А(H1N1)pdm09 (<i>n</i> * = 30) Ct** ≤ 28	грипп В (<i>n</i> = 40) Ct ≤ 28	грипп А(H1N1)pdm09	грипп В	грипп А(H1N1)pdm09 (<i>n</i> = 30) Ct ≤ 25
MDCK	10	28	≤ 1:4	1:4–1:128	0
CaCo-2(2)	9	26	≤ 1:4	1:4–1:64	4

Примечание. * *n* – общее количество ПЦР-положительных проб, отображенных для выделения вирусов гриппа на клеточных линиях MDCK и CaCo-2; **Ct – значение порогового цикла в реакции ПЦР в режиме реального времени, при котором детектировали вирусную РНК в исследуемых пробах/образцах.

Выделение вирусов гриппа В из клинических материалов от больных. Для выделения вируса гриппа В отобрали 40 материалов, в которых методом ПЦР определили наличие РНК вируса гриппа В. На клеточной линии MDCK выделили 28 вирусов и 26 вирусов на клетках CaCo-2(2), т. е. результаты выделения были сравнимы на обеих клеточных линиях. Большинство вирусов выделялось уже при первичном заражении и имело высокие титры ГА, хотя количество вирусов с высокими титрами ГА на клетках CaCo-2(2) было ниже, чем на клетках MDCK (рис. 3).

Общий результат эффективности выделения вирусов гриппа А и В из клинических образцов от больных на двух клеточных линиях MDCK и CaCo-2(2) можно считать практически одинаковым (табл. 2). Следует отметить более высокий процент выделения вируса гриппа В на обеих клеточных линиях по сравнению с таковым пандемического вируса гриппа А. Положительным моментом является выделение 4 вирусов пандемического гриппа из постмортальных материалов только на клетках CaCo-2 при отрицательном результате на клетках MDCK.

Обсуждение

Клетки CaCo-2, полученные в 1983 г. М. Pinto и соавт. [10] из аденокарциномы ободочной кишки человека, обнаружили спонтанную дифференцировку в энтероциты при формировании сомкнутого монослоя. В связи с этим эту клеточную линию широко используют в качестве модели для изучения дифференцировки и регуляции интегральных функций. Клетки CaCo-2 характеризуются поляризованностью, о чем свидетельствуют работы по изучению эндоцитоза и экзоцитоза биологически активных белков при использовании ингибиторов микротрубочек и актина [13]. Уже самые ранние работы на клетках CaCo-2 обнаружили ее гетерогенность, которая проявлялась в характеристике клонов, полученных из родительской линии, различающихся по морфологии, интенсивности роста, продукции факторов роста и других биологически активных молекул, проницаемости, электрической устойчивости и другим маркерам [16]. Результаты работ последних лет подтвердили гетерогенность клеток CaCo-2, а также влияние на клонированную изменчивость длительности и условий культивирования [17].

Эти данные могут объяснить наши результаты при работе с линией CaCo-2(1), клетки которой при увеличении количества пассажей на среде альфа-МЕМ приобрели менее дифференцированный вид с потерей поляризованности и соответственно снижением чувствительности к вирусам гриппа А.

Результаты исследований, которые провели на другой линии клеток CaCo-2(2), сохранившей свою дифференцированность при переводе на другую питательную среду, убедительно подтверждают факт существования и распространенности среди исследователей линий клеток CaCo-2, различающихся по степени дифференцировки и стабильности. Неучтенные факторы при культивировании клеток могут способствовать снижению дифференцировки клеток и соответственно снижению чувствительности к ряду вирусов.

Австрийскую линию клеток CaCo-2(2), имеющую стабильные характеристики дифференцировки, успешно использовали при выделении вирусов гриппа А и В. Результаты по эффективности выделения на клетках CaCo-2(2) вирусов гриппа А и В мало отличаются от результатов, полученных на клетках MDCK. В то же время на клетках CaCo-2(2) выделили 4 вируса пандемического гриппа А из постмортальных материалов при отрицательном результате на клетках MDCK.

В последние годы появилось несколько сообщений об

использовании клеток CaCo-2 для работы с вирусами гриппа А различного происхождения. Об успешном применении клеток CaCo-2 при выделении вирусов гриппа от свиней сообщили С. Chiaroni и соавт. [18]. Об использовании клеток CaCo-2 для работы с низкопатогенными штаммами вируса птичьего гриппа было сообщено А. Jahangir и соавт. [19]: 17 низкопатогенных вирусов репродуцировались в высоких титрах и образовывали бляшки в клетках CaCo-2 более эффективно, чем в клетках MDCK, при этом не отмечено фенотипических и генотипических изменений на протяжении 10 пассажей. Однако эти клетки оказались менее чувствительными при выделении птичьих вирусов, чем куриные эмбрионы.

Высокая чувствительность клеток CaCo-2, сравнимая с таковой клеток MDCK, к вирусам гриппа А различного происхождения: А(Н1N1) эпидемического, А(Н1N1) пандемического и А(Н5N1), отмечена в работе [20].

Наши результаты, а также результаты, полученные другими исследователями, позволяют сделать вывод о несомненной ценности и значимости клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека CaCo-2. Особенный интерес клетки CaCo-2, которые являются дифференцированными энтероцитами человека, могут представлять при изучении кишечных вирусов, и в частности при кишечных формах гриппозной инфекции.

Авторы выражают благодарность канд. мед. наук М.П. Груднину и другим сотрудникам лаборатории молекулярной вирусологии за ПЦР-диагностику в режиме реального времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO manual on influenza diagnosis and surveillance. 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf - 10.11.2011
2. Mochalova L., Gambaryan A., Romanova J. et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology*. 2003; 313: 473–80.
3. Madin S.H., Darby N.B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958; 98: 574–6.
4. Tobita K., Sugiura A., Enomoto C., Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.* 1975; 162: 9–14.
5. Bouvier N., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26 (Suppl. 4): D49–53.
6. Matrosovich M., Matrosovich J., Carr N.A. et al. Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.* 2003; 77: 8418–25.
7. Hatakeyama S., Sakai-Tagawa Y., Kiso M. et al. Enhanced expression of an α -2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4139–46.
8. Chu C., Lugovtsev V., Lewis A. et al. Production and antigenic properties of influenza virus from suspension MDCK-siat7e cells in a bench-scale bioreactor. *Vaccine*. 2010; 28: 7193–201.
9. Li N., Zhang F.Y., Yu X.H. et al. Overexpression of α -2,6 sialyltransferase stimulates propagation of human influenza viruses in Vero cells. *Acta Virol.* 2011; 55: 147–53.
10. Pinto M., Robin-Leon S., Appay M.T. et al. Enteroocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. *Biol. Cell*. 1983; 7: 323–30.
11. Yoshino S., Yamamoto S., Kawabata N. Use of CaCo-2 cells for isolation of influenza virus. *Kansenshogaku Zasshi*. 1998; 72: 347–51.
12. Zhirnov O., Klenk H.D. Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. *Virology*. 2003; 15: 198–212.
13. Jackman M.R., Shurety W., Ellis J.A. et al. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in CaCo-2 cells by cytochalasin D. *J. Cell Sci.* 1994; 107: 2547–56.
14. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М. и др. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и человека. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (6): 14–9.
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
16. Woodcock S., Williamson I., Hassan I. et al. Isolation and characterization of clones from the CaCo-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport. *J. Cell Sci.* 1991; 98: 323–32.
17. Jahn K.A., Biazik J.M., Braet F. GM1 expression in CaCo-2 cells: char-

acterization of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. J. Pharm. Sci. 2011; 100: 3751–62.

18. Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C. et al. Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standart substrates for isolation of swine influenza A viruses. J. Virol. Meth. 2010; 163: 162–5.
19. Jahangir A., Ruenphet S., Hara K. et al. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. J. Virol. Meth. 2010; 169: 232–8.
20. Li I.W.S., Chan K.H., To K.W.K. et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. J. Clin. Virol. 2009; 46 (4): 325–30.

REFERENCES

1. WHO manual on influenza diagnosis and surveillance. 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf - 10.11.2011
2. Mochalova L., Gambaryan A., Romanova J. et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. Virology. 2003; 313: 473–80.
3. Madin S.H., Darby N.B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 98: 574–6.
4. Tobita K., Sugiura A., Enomoto C., Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. Med. Microbiol. Immunol. 1975; 162: 9–14.
5. Bouvier N., Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008; 26 (Suppl. 4): D49–53.
6. Matrosovich M., Matrosovich J., Carr N.A et al. Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. J. Virol. 2003; 77: 8418–25.
7. Hatakeyama S., Sakai-Tagawa Y., Kiso M. et al. Enhanced expression of an α -2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4139–46.
8. Chu C., Lugovtsev V., Lewis A. et al. Production and antigenic properties of influenza virus from suspension MDCK-siat7e cells in

a bench-scale bioreactor. Vaccine. 2010; 28: 7193–201.

9. Li N., Zhang F.Y., Yu X.H. et al. Overexpression of α -2,6 sialyltransferase stimulates propagation of human influenza viruses in Vero cells. Acta Virol. 2011; 55: 147–53.
10. Pinto M., Robin-Leon S., Appay M.T. et al. Enteroocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. Biol. Cell. 1983; 7: 323–30.
11. Yoshino S., Yamamoto S., Kawabata N. Use of CaCo-2 cells for isolation of influenza virus. Kansenshogaku Zasshi. 1998; 72: 347–51.
12. Zhirnov O., Klenk H.D. Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. Virology. 2003; 15: 198–212.
13. Jackman M.R., Shurety W., Ellis J.A. et al. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in CaCo-2 cells by cytochalasin D. J. Cell Sci. 1994; 107: 2547–56.
14. Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M. et al. Voprosy virusologii. 2011; 56 (6): 14–9 (in Russian).
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27: 493–7.
16. Woodcock S., Williamson L., Hassan I. et al. Isolation and characterization of clones from the CaCo-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport. J. Cell Sci. 1991; 98: 323–32.
17. Jahn K.A., Biazik J.M., Braet F. GM1 expression in CaCo-2 cells: characterization of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. J. Pharm. Sci. 2011; 100: 3751–62.
18. Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C. et al. Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standart substrates for isolation of swine influenza A viruses. J. Virol. Meth. 2010; 163: 162–5.
19. Jahangir A., Ruenphet S., Hara K. et al. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. J. Virol. Meth. 2010; 169: 232–8.
20. Li I.W.S., Chan K.H., To K.W.K. et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. J. Clin. Virol. 2009; 46 (4): 325–30.

Поступила 16.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.121.015.44

М.В. Полковникова, Н.Н. Носик, Т.М. Гараев, Н.Г. Кондрашина, М.П. Финогенова, В.А. Шибнев

Изучение противогерпетических свойств экстрактов из березового гриба *Inonotus Obliquus*

фГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», Минздрава России, 123098, г. Москва

Разработаны различные схемы получения экстрактов березового гриба – чаги (*Inonotus obliquus*), обладающего высоким содержанием биологически активных веществ. Установлено, что водные, водно-спиртовые и щелочные экстракты мало токсичны для клеток и обладают способностью защищать культуру клеток Vero от цитодеструктивного действия вируса простого герпеса. Изученная более детально фракция IV, полученная методом щелочной экстракции, в концентрации 5,0 мкг/мл полностью защищала клетки при внесении до или в течение часа после инфицирования вирусом простого герпеса, тип 1.

Ключевые слова: березовый гриб чага; вирус простого герпеса; противовирусное действие; культура клеток Vero.

A study of the antiherpetic activity of the chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*) extracts in the Vero cells infected with the herpes simplex virus

M. V. Polkovnikova, N. N. Nosik, T. M. Garaev, N. G. Kondrashina, M. P. Phinogenova, V. A. Shibnev

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) contains a wide range of excellent bioactive compounds. However, limited information exists on the antiviral activity of the compounds extracted from chaga. A number of subfractions of chaga were obtained using different solvents and different procedures. The subfractions of chaga extracted with water, alcohol, alkali were tested for their toxicity for the Vero cell culture and antiviral effect in the Vero cells infected with the Herpes simplex virus (HSV), Type 1. It was shown that most of the subfractions were not toxic for the Vero cells and had protective effect on the Vero cells infected with HSV. The subfraction IV in the concentration 5 μ g/ml protected the Vero cells from cytodestructive action of HSV and no viral DNA was detected in infected cells treated with chaga extracts. Best protective effect was observed when compound was added before or within one hour after the Vero cells were infected with HSV.

Key words: chaga mushroom (*Inonotus obliquus*); herpes simplex virus; protective effect, Vero cells.