

# Селекция вируса ЕСНО11 по признаку рецепторной специфичности в трансформированных моноцитах человека

Ф. А. Фадеев, А. Г. Сергеев, А. В. Устюжанин

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии,  
Уральской государственной медицинской академии Росздрава, г. Екатеринбург

Энтеровирусы являются возбудителями широкого спектра инфекционных заболеваний благодаря способности к репродукции во многих органах и тканях человека. Чрезвычайно широкий диапазон клеток-хозяев объясняется особенностями их рецепторной специфичности. Основным клеточным рецептором большинства энтеровирусов является гликопротеин DAF (CD55), который относится к семейству белков-регуляторов, защищающих клетки от комплементзависимого лизиса. DAF присутствует на поверхности подавляющего большинства адгезирующих клеток, а также на эритроцитах [4].

Эксперименты, проведенные на модели вируса ЕСНО11 показали, что в вирусной популяции присутствуют неаффинные к DAF мутантные формы с измененной рецепторной специфичностью, использующие альтернативный механизм проникновения в клетку без участия данного рецептора [5]. При этом было обнаружено, что репродукция вируса на перевиваемой культуре клеток моноцитарного ряда Л-41 сопровождалась преимущественной продукцией DAF-мутантов [2]. Полученные результаты позволили высказать предположение о том, что в инфицированном организме на стадии вирусемии может происходить репродукция неаффинных к рецептору DAF мутантов вируса в клетках миелоидного ряда. Для проверки данного предположения использовали миелобласты, выделенные из крови больного острым нелимфобластным лейкозом (М-1).

**Цель работы** — оценка репродуктивной активности DAF<sup>+</sup> и DAF<sup>-</sup> вариантов вируса ЕСНО11 на миелобластах человека.

## Материалы и методы

В работе использовали DAF<sup>+</sup> клон 111 вируса ЕСНО11, выделенный на клеточной культуре RD (клетки рабдомиосаркомы человека), а также адаптированный к клеткам Л-41 DAF<sup>-</sup> вариант этого же клона — 111Л41. Культивирование

вируса на перевиваемых клеточных линиях осуществляли общепринятыми методами [1].

Чтобы исключить возможность проявления остаточной инфекционной активности вируса, содержащегося в инокуляте, для заражения миелобластов использовали фотосенсибилизированный вирус (ФСВ), полученный при культивировании в среде поддержания с добавлением 0,001% нейтрального красного. Под воздействием света в сенсibilизированных красителем вирусных частицах происходило разрушение РНК, вследствие чего они утрачивали инфекционность.

Миелобласты человека выделяли из крови больного острым миелолойкозом (М-1). Примесь эритроцитов удаляли центрифугированием в растворе фиколл-урографина ( $\rho = 1,077$  г/мл) при 1 500 об./мин. в течение 15 мин. После очистки клетки ресуспендировали в смеси сред Игла и RPMI-1640 с добавлением 10% коровьей сыворотки, доводя до концентрации 150 тыс. клеток/мл среды. Полученную суспензию разливали в пенициллиновые флаконы по 4 мл, после чего во флаконы вносили по 100 мкл вируссодержащей жидкости. После заражения клеток флаконы инкубировали в темноте при 37°C в течение 120 часов, затем засвечивали их лампой накаливания в течение 20 мин. для инактивации остатков вируса из исходного инокулята.

Для контроля полноты фотоинактивации 100 мкл исходного ФСВ разводили в 4 мл среды Игла, после чего подвергали флакон со средой воздействию света и оценивали ее остаточную инфекционную активность.

Выживаемость незараженных клеток оценивали с использованием трипанового синего. Для этого смешивали равные объемы клеточной суспензии и 0,1% раствора красителя. После инкубации смеси при комнатной температуре в течение 10 мин. подсчитывали процент окрашенных клеток в камере Горяева. Непосредственно после очистки лейкоцитарной мас-

Таблица. Репродуктивная активность DAF<sup>+</sup> клона 111 и DAF<sup>-</sup> клона 111Л41 на миелобластах человека

Клон	Контроль, I ± m (БОЕ/мл)**	ИА* вируса после репродукции в культуре миелобластов, I ± m (БОЕ/мл)	Остаточная ИА после инкубации с эритроцитами, I ± m (БОЕ/мл)	Соотношение ИА до и после инкубации с эритроцитами, I ± Δ
111	< 10 <sup>2</sup>	(1,8 ± 0,2) × 10 <sup>7</sup>	(2,6 ± 0,2) × 10 <sup>6</sup>	7,0 ± 0,7
111Л41	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	—	—

Примечание. \* ИА — инфекционная активность;

\*\* — для контроля полноты фотинактивации вируса исходный фотосенсибилизированный вирус разводили средой Игла до той же концентрации, что и при заражении клеток, после чего подвергли его воздействию света.

сы от эритроцитов доля погибших клеток составляла около 5%. После 72 часов инкубации в питательной среде при 37°C выживаемость клеток составила 80%, а через 120 часов — 50%.

Инфекционную активность вируса оценивали в реакции бляшкообразования. Оценку инфекционной активности клона 111 осуществляли на клетках RD (клетки рабдомиосаркомы), клона 111Л41 — на клетках Л-4. Для постановки реакции клеточный монослой заражали соответствующим разведением вирусосодержащей жидкости в объеме 0,2 мл. Адсорбцию вируса на клетках проводили в течение часа, после чего монослой покрывали питательным агаром с добавлением нейтрального красного. Количество бляшек учитывали через 72 часа.

Сродство вируса к DAF определяли в реакции геммагглютинации [1]. Неаффинный к DAF вирус утрачивал способность агглютинировать эритроциты человека [4].

Достоверность изменения инфекционной активности вируса оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни [1].

### Результаты исследования и их обсуждение

По данным литературы известно, что клетки миелоидного ряда экспрессируют рецептор DAF [3]. Для подтверждения присутствия этого рецептора на мембране миелобластов 8 млн клеток суспендировали в 500 мкл вирусосодержащей жидкости (DAF<sup>+</sup> клон 111) с исходной инфекционной активностью (4,6 ± 0,5) × 10<sup>8</sup> БОЕ/мл. После инкубации при 4°C в течение 60 мин. клетки удаляли центрифугированием, при этом остаточный титр вируса в надосадочной жидкости составил (4,1 ± 0,4) × 10<sup>7</sup> БОЕ/мл. Соотношение инфекционной активности до и после инкубации вирусосодержащей жидкости с миелобластами составило (11,2 ± 3,2) : 1 (различия статистически достоверны), что свидетельствовало об экспрессии рецептора DAF на этих клетках.

Для оценки репродуктивной активности вируса ECHO11 суспензию миелобластов зара-

жали фотосенсибилизированными DAF<sup>-</sup> клоном 111 и адаптированным к перевиваемой культуре клеток моноцитарного ряда DAF<sup>-</sup> клоном 111Л41. После инкубации при 37°C в течение 120 часов клеточную суспензию подвергали воздействию света для инактивации сохранившегося инфекционность фотосенсибилизированного вируса. Представленные в таблице результаты оценки инфекционной активности полученного вирусного потомства позволяют сделать вывод о том, что геммагглютинирующий (DAF<sup>+</sup>) вирус из клона 111 способен к активной репродукции в миелобластах, в то время как DAF<sup>-</sup> вариант 111Л41 не размножался на этих клетках.

Клон 111 после репродукции на лейкоцитах проявлял геммагглютинирующую активность, что свидетельствовало о присутствии в вирусной популяции DAF<sup>-</sup> частиц. Однако это не исключало присутствия в составе популяции значительного количества DAF<sup>-</sup> вариантов. Для определения доли DAF<sup>+</sup> частиц в вирусном потомстве 100 мкл эритроцитов человека суспендировали в 0,5 мл вирусосодержащей жидкости, полученной после репродукции клона 111 на лейкоцитах. Инкубация суспензии при 4°C в течение 60 мин. привела к уменьшению концентрации вируса в надосадочной жидкости в 7 раз (таблица). Таким образом, подавляющее большинство вирусных частиц в потомстве клона 111 после репродукции на лейкоцитах имели DAF<sup>+</sup> фенотип. Это позволило сделать вывод о том, что миелобласты, выделенные из крови человека, поддерживают репродукцию DAF<sup>-</sup> вариантов вируса ECHO11 и не обладают, в отличие от культурных клеток Л-41, выраженной способностью к селекции DAF<sup>-</sup> частиц с измененной рецепторной специфичностью. В то же время, DAF<sup>-</sup> вирус, адаптированный к клеткам Л-41 (111Л41), не способен к репродукции в миелобластах.

Трансформированные миелобласты человека, выделенные от больного лейкозом, и перевиваемая культура клеток моноцитарного ряда проявили неодинаковую селективную ак-

тивность по признаку рецепторной специфичности в отношении ЕСНО11, что свидетельствует о различиях в их чувствительности к данному вирусу. Таким образом, перевиваемые клеточные культуры, являющиеся производными какого-либо типа клеток человеческого организма, не всегда могут служить адекватной моделью для изучения особенностей репродукции вируса на этих клетках *in vivo*.

### Выводы

1. Исходный DAF<sup>+</sup> вирус ЕСНО11 обладает высокой репродуктивной активностью в первичной культуре миелобластов.

2. Трансформированные миелобласты человека, в отличие от перевиваемой культуры Л1-41, являющейся их дериватом, не обладают селективными свойствами в отношении DAF<sup>+</sup> мутантов вируса ЕСНО 11.

### Литература

1. Карьшева А. Ф. Руководство по практической вирусологии / А. Ф. Карьшева, В. Н. Сюрин. — Кипшикев: Штинца, 1920. — 212 с.
2. Фадеев Ф. А. Квазивидовая структура популяции энтеровирусов по признаку специфичности: антирецептора и ее динамика на различных клеточных культурах / Ф. А. Фадеев, А. В. Новоселов, А. Г. Сергеев // Вестник УГМА. — Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2003. — №11. — С.68–73.
3. Nicholson-Weller A. Structure and function of decay-accelerating factor / A. Nicholson-Weller, C. E. Wang // J. Lab. Clin. Med. — 1994. — V.123, №4. — P. 485–491.
4. Powell R. M. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some hemagglutinating strains use more than one cellular receptor / R. M. Powell, V. Schmitt, T. Ward, I. Goodfellow, D. J. Evans, J. W. Almond // J. of Gen. Virol. — 1998. — V. 79. — P. 1707–1713.
5. Sergeev A. G. Genetic analysis of echovirus 11 variability in adsorption to human erythrocytes / A. G. Sergeev, A. V. Novoselov, A. V. Bubenchikov // Arch. Virol. — 1994. — V.134, №1–2. — P.129–139.