

Е. А. СУПТЕЛЬ, Н. А. МАКСИМОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ С ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ

(Представлено академиком А. В. Палладиным 5 V 1970)

Роль макрофагов в патогенезе вирусных инфекций окончательно не выяснена. Нами изучена динамика накопления вирусов Коксаки, герпеса и адено в макрофагах и цитологические изменения, происходящие в них под влиянием указанных возбудителей.

Методика. Использованы эталонные штаммы вирусов Коксаки А7 ($10^{6,5}$ ЦПД_{50/0,1} мл), Коксаки А6 ($10^{6,3}$ ИД_{50/0,03} мл), адено 7-го типа (10^5 ЦПД_{50/0,1} мл), герпеса, штамм L-2 ($10^{6,5}$ ЦПД_{50/0,1} мл), которыми инфицировались животные и культуры тканей.

Чувствительными животными при заражении вирусом Коксаки служили 1—2-, вирусом герпеса 3—4-недельные мыши и аденовирусом — сирийские хомяки, которых забивали через 5—10 мин., 3 часа, 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 суток после внутривенного заражения. Мышам вводили 0,2 мл, а хомякам 0,5 мл вирусосодержащего материала в разведении 1:5.

Обогащенный макрофагами перитонеальный экссудат мышей и сирийских хомяков, а также культуры макрофагов получены по общепринятой методике. Для гистологических и иммунофлуоресцентных исследований макрофаги выращивали на пластинках слюды.

Культуры макрофагов инфицировались вирусами в объеме 0,1 мл, инкубировались при температуре 37° 1 час, промывались трижды фосфатным буфером (рН 7,0), затем иммунной сывороткой, опять буфером и заливались 1 мл среды 199. Клетки в динамике после заражения разрушали замораживанием, наличие вирусов в них определяли путем заражения новорожденных мышей (Коксаки А6), первичных культур клеток почек обезьян (Коксаки А7), перевиваемых Нер-2 (адено-вирусы) и амниотических А8 (вирус герпеса). Указанные чувствительные культуры, инфицированные указанными возбудителями, подвергали тем же видам исследований, что и культура макрофагов.

Присутствие вирусного антигена в перитонеальных макрофагах зараженных животных и культурах макрофагов определяли методом иммунофлуоресценции в прямой и непрямой модификациях с необходимыми контролями.

Результаты. В первой серии экспериментов изучалось содержание вирусов в перитонеальных макрофагах чувствительных животных. Уже через 7—15 мин. после заражения вирус Коксаки А7 обнаружен в макрофагах, титр его возрос через 4 часа, а затем постепенно снизился и на восьмые сутки определялся в изучаемых клетках в низких титрах (рис. 1, 1).

При заражении вирусами Коксаки А6, герпеса и адено некоторое повышение титра сменялось снижением его, а на 8—10 сутки возбудители определялись в невысоких титрах.

При обработке флуоресцирующими иммунными глобулинами перитонеального экссудата, взятого у зараженных чувствительных животных, светящиеся конгломераты обнаружены в цитоплазме нейтрофилов, лимфоциты светились целиком; в моноцитах мышей, инфицированных вирусом Коксаки, антиген располагался в цитоплазме, вблизи ядра, в ядрышках, ядра же оставались оптически пустыми (рис. 2, а), а в моноцитах, зараженных герпес- и адено-вирусами, антиген локализовался преимущественно в ядре. Светящиеся клетки можно было обнаружить уже через 7—13 мин. после заражения и наблюдать в течение последующих 2 недель,

причем светилось 10—15 клеток на 100 просмотренных, а через 8—14 суток количество светящихся клеток и интенсивность свечения снижались (рис. 2 см. вкл. к стр. 957).

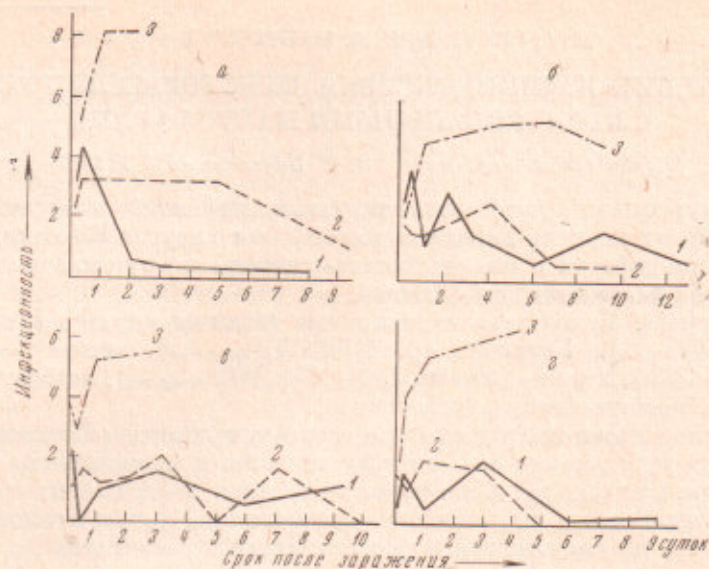


Рис. 1. Динамика размножения вирусов Коксаки А7 (а), А6 (б), герпеса (в), адено (г) в перитонеальных макрофагах восприимчивых животных (1), клеточных культурах макрофагов (2) и чувствительных к указанным вирусам культурах тканей (3). Инфекционность: в \log ЦПД_{50/0,1 мл для вирусов Коксаки А7, адено, герпес (а, в, г) и в \log ЛД_{50/0,03 мл для Коксаки А6 (б)}}

Для выявления скорости захвата изучаемых вирусов макрофагами были поставлены следующие эксперименты: к перитонеальному экссудату *in vitro* добавлялся возбудитель, смесь инкубировалась при 37°, через каждую минуту после контакта вируса с клетками готовились мазки, которые обрабатывались флуоресцирующими антителами. Оказалось, что уже через 7—13 мин. вирусный антиген появлялся в макрофагах, что свидетельствует в пользу быстрого захвата возбудителя этими клетками.

Во второй серии опытов изучалось взаимодействие вирусов с культурой макрофагов. Односуточная культура представляет собой клеточный монослой, состоящий из лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, клеток эндотелия брюшины; на 3—4 сутки роста лимфоциты и нейтрофилы разрушались и культура имела мономорфный характер; она состояла из моноцитов с незначительной (1—2%) примесью клеток эндотелия брюшины (рис. 2, б).

В культурах макрофагов, инфицированных вирусами Коксаки А7—А6, адено и герпеса, повышение содержания возбудителей чередовалось со снижением, а исчезновение из клеток отмечалось на 5—14 сутки после заражения (см. рис. 1, 2). На рисунке рис. 1, 3 показано быстрое накопление вирусов, которыми инфицированы чувствительные культуры клеток. На 2—3 сутки культуры разрушались целиком, а титр вируса в них достигал $10^{5,5-8}$ ЦПД_{50/0,1 мл}.

В культурах макрофагов, инфицированных вирусами Коксаки и обработанных флуоресцирующими антителами, антиген выявлен в цитоплазме (рис. 2, в), иногда клетка светилась целиком, при заражении же адено- и герпес-вирусами свечение преимущественно локализовалось в ядерной субстанции (рис. 2, г).

При гистологическом исследовании культуры макрофагов, подвергнутой действию вирусов Коксаки, герпес и адено, проведенном в те же сроки, что и вирусологические исследования, изменений не обнаружено. Под

влиянием указанных вирусов в чувствительных культурах выявлены специфические поражения.

С целью установления длительности пребывания вирусов в макрофагах, последние, взятые у инфицированных вирусами Коксаки, герпеса, адено животных, культивировались по вышеописанной методике. Пассажи на чувствительных культурах проводились на 4—26 сутки после посадки макрофагов. При подобной постановке эксперимента изучаемые вирусы выявлялись в макрофагах инфицированных животных еще более продолжительный срок — вплоть до 22 суток.

Итак, уже через 7—13 мин. после контакта вирусы Коксаки, адено и герпеса обнаруживаются в макрофагах, что доказано в опытах *in vivo* и *in vitro* как вирусологическими методами, так и методом флуоресцирующих антител.

Согласно данным литературы, срок проникновения полиовирусов в чувствительные к ним клетки колебался в пределах 20—40 мин. (8), герпеса от 15 мин. до 3 час. (9), парагриппа 10 мин. (4). По-видимому, макрофаги значительно быстрее, чем другие клетки, способны захватывать возбудителей вирусной природы. Процесс проникновения вирусов полиомиелита и везикулярного стоматита в макрофаги связывают с феноменом пиноцитоза (2, 3).

Способность вирусов сохраняться в макрофагах не нарушая гистологической структуры последних, позволяет трактовать данный процесс как латентное вирусоносительство. Вирусы, находясь в цитоплазме макрофагов, не подвержены действию ингибиторов, антител и других разрушающих вирус факторов, что способствует сохранению инфекционности вируса. Как клетки, мигрирующие по организму, макрофаги активно распространяют возбудитель.

Сравнивая кривые, характеризующие динамику вирусов Коксаки, герпеса и адено в макрофагах чувствительных животных, в культуре клеток макрофагов и в чувствительных к указанным вирусам культурах, можно видеть резкое увеличение титра вируса в последних, что свидетельствует в пользу размножения возбудителя; в макрофагах же титр вируса повышался лишь незначительно, на основании чего можно сделать предположение о возможности размножения его в этих клетках.

Некоторые исследователи (8, 10, 7) отрицают возможность размножения энтеровирусов в культуре макрофагов, парагриппа и вируса болезни Нью-Касла в культуре лимфоцитов (10). Наши результаты подтверждаются данными других исследователей, которые установили возможность размножения вируса везикулярного стоматита в культуре макрофагов (5), герпеса и Коксаки А11 в культуре лейкоцитов человека (4), герпеса, Коксаки А15, ЕСНО 11, везикулярного стоматита в культуре лимфоцитов, полученной из периферической крови человека (10), эти вирусы вызывают разрушение культуры, а адено-, рео- и полиовирусы способны к репликации, но не обладают цитопатогенным действием.

Таким образом, показана возможность сохранения вируса в макрофагах *in vivo* и *in vitro*, что способствует распространению его в организме. Последнее может иметь большое значение в патогенезе вирусных болезней.

Киевский научно-исследовательский
институт инфекционных болезней

Поступило
26 IV 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 И. Ф. Баринский, И. В. Дементьев, Т. А. Бектемиров, *Вопр. вирусол.*, № 1 (1968). 2 А. А. Кязимова, А. А. Смеродинцев, Г. И. Илин, *Acta virol.*, 5, 414 (1968). 3 А. А. Смеродинцев, *Вопросы патогенеза и иммунологии респираторных инфекций*, Л., 1969. 4 А. А. Соминина, *Вопр. вирусол.*, № 3, 368 (1969). 5 R. Edelman, F. Wheelock, *J. Virol.*, 1, № 6, 1139 (1967). 6 I. I. Holland, L. C. McLaren, *J. Exp. Med.*, 109, 487 (1959). 7 M. Kantoch, N. Dobrowolska, *Acta virol.*, 13, 2, 53 (1969). 8 P. J. Tegtmeyer, J. E. Craighead, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 129, № 3, 690 (1968). 9 J. F. Watkins, *J. Gen. Microbiol.*, 22, 49 (1960). 10 R. E. Wallace, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 130, 3, 702 (1969).