

УДК 616.9; 608.3:576.08; 57.085.23; 57.047

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЦИТОПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ В МАКРОФАГАХ

© 2013 г. Н. Г. Плехова**, Л. М. Сомова*, Н. В. Крылова*, Г. Н. Леонова*,
И. Н. Ляпун*, И. С. Смирнов**

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток, 690087

**Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, 690950

e-mail: pl_nat@hotmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2011 г.

Приведены результаты исследования метаболизма макрофагов при их заражении вирусами, различающимися по вирулентности. Для оптимизации оценки цитопатогенного действия вирусов на макрофаги предложен индекс реактивности клеток, который позволил выявить степень вирусного воздействия в условных единицах. Применение высокочувствительных методов определения функциональной активности макрофагов и выявление корреляционной связи между ее изменениями и морфологическими особенностями клеток можно отнести к объективным способам индикации не только репродукции вирусов, но и дифференцировки типов и степени их цитопатогенного действия.

DOI: 10.7868/S0555109913010157

Клетки моноцитарного происхождения в силу доступности методов их выделения, фракционирования и культивирования из периферической крови служат удобной моделью для изучения ряда общих цитофизиологических закономерностей. Функциональные свойства клеток моноцитарного происхождения настолько многообразны, что их неполноценность, как следствие или причина патологического процесса, со временем неизбежно формирует системное поражение организма, сопровождающееся иммунологической недостаточностью [1–3]. В процессе дифференцировки из промиелоцита в моноцит на поверхности плазматической мембраны образуются многочисленные рецепторы, принимающие участие в процессах адгезии, эндо- и фагоцитоза, межклеточного взаимодействия и восприятия регуляторных воздействий [4]. Популяция моноцитов у человека идентифицируется по экспрессии специфического рецептора – кластера дифференцировки 14 (cluster of differentiation – CD), а субпопуляции – по степени его выраженности на мембране, а также наличия дополнительного рецептора – CD16 [5]. Субпопуляция моноцитов, имеющая высокую степень экспрессии рецептора CD14 и отсутствие – CD16, относится к “классическим”, составляющим у здоровых взрослых людей 90–95% от общего числа моноцитов, а субпопуляция с экспрессией CD16 (CD14⁺, CD16⁺) – к “провоспалительным” [6].

Система мононуклеарных фагоцитов филогенетически относится к древней линии защиты

организма. На каждой эволюционной ступени видов от простейших одноклеточных до млекопитающих выявляются клетки, способные к фагоцитозу [7]. Среди представителей позвоночных не выявлено существенных различий в характеристиках фагоцитирующих клеток, что определяет эти клетки как объекты для постоянного воздействия различных инфекционных агентов, в том числе вирусов. При длительном сосуществовании фагоцитов и вирусов возникают условия для адгезии вирусных частиц к поверхности макрофагов. Показано, что в процессе прикрепления вирусов, например флавивирусов – Денге и клещевого энцефалита и полиовируса, принимает участие гепарансульфатный протеогликан – рецептор макрофагов [8–11].

В зависимости от проявляемых свойств инфекционного агента происходит активация клетки. Прямое противовирусное действие макрофагов реализуется при активации следующих основных механизмов микробицидности: кислородзависимое, кислороднезависимое и нитроксидобразующее. Кислороднезависимые механизмы активируются в процессе слияния фагосом и лизосом, а кислородзависимые механизмы играют ведущую роль в деструкции объекта фагоцитоза. Этот процесс происходит при стимулировании комплекса НАДФ-оксидазы, также известной как фагоцитарная оксидаза или оксидаза кислородного взрыва. При ее участии происходит образование активных форм кислорода: супероксидного анион-радикала O₂⁻,

пероксида водорода H_2O_2 , гидроксильного радикала OH^\cdot и др. Исследования недавних лет показали, что в стимулированных вирусами и провоспалительными цитокинами макрофагах, наряду с продукцией активных метаболитов кислорода, происходит образование оксида азота [12, 13]. Оксид азота (NO) — это газовая молекула со свойствами свободного радикала, имеющая неспаренный электрон, что придает ей высокую активность к реакции с кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков [14]. В макрофагах образование NO осуществляется двумя путями — нитроксидсинтазным, при окислении аминокислоты L-аргинин в присутствии фермента синтазы оксида азота, и нитритредуктазным, действующим в условиях дефицита кислорода при активации нитритредуктазных систем, связанных с гемсодержащими белками — гемоглобином, миоглобином, цитохромоксидазой и др. [15]. Таким образом, нитроксидобразующая активность моноцитов (макрофагов) малоизученная при вирусных инфекциях, представляет определенный интерес, в точки зрения этих клеток в защите организма.

Способность вируса вызывать специфическую морфологическую и функциональную патологию зараженных им клеток, культивируемых вне организма, называется цитопатогенностью. Различают 3 типа цитопатогенного эффекта вирусов: цитолитический, трансформирующий, индуктивный [7]. Цитолитический эффект характеризуется общей деструкцией клетки, которой предшествуют морфологические изменения клеточных органелл и разрушение митохондрий. При трансформирующем эффекте зараженная вирусом клетка приобретает способность к неограниченной пролиферации. Индуктивный цитопатический эффект характеризуется способностью вируса стимулировать инфицированные клетки к продукции цитокинов.

Феномен цитопатического эффекта используют для диагностики, идентификации и титрования вирусов в культуре клеток. При сравнении в строго контролируемых условиях нескольких штаммов вирусов их цитопатогенное действие может иметь количественное выражение, а его степень измеряется в количестве вирусных частиц, необходимых для заражения культуры клеток. При поддержании штаммов вирусов в лабораторных условиях их свойства часто изменяются как в сторону усиления, так и ослабления, и определение цитопатогенных свойств вирусов приобретает особенный смысл, связанный с постановкой различных научных экспериментов.

Цель работы — сравнительное исследование особенностей метаболизма макрофагов при заражении вирусами, различающимися по степени

вирулентности, и морфологических изменений этих клеток.

МЕТОДИКА

Первичную культуру макрофагов получали из перитонеальной полости беспородных белых мышей. Для экспериментов использовали концентрацию 2×10^6 кл./мл в среде состава института памяти Рувелл Парка (Roswell Park Memorial Institute medium — RPMI) (фирма “Sigma”) с 5% эмбриональной бычьей сывороткой (фирма “ICN”). Суспензию клеток разносили по 100 мкл в лунки иммунологического плоскодонного планшета. После 40 мин инкубации в термостате при $37^\circ C$ в смешанной атмосфере с присутствием 5% CO_2 неадгезированные клетки дважды отмывали теплой средой RPMI и в 200 мкл среды, включающей 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мкм глутамин и 0.2 мкм гентамицина, оставляли на 3 сут для окончательной дифференцировки клеток.

Для заражения клеток был взят высоковирулентный штамм “Primorye-73” (P-73) вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенный из мозга умершего больного клещевым энцефалитом, и два штамма Primorye-202 и Primorye-69 (P-202 и P-69), выделенные из крови больных лихорадочной формой заболевания. Также использовали вирусы сем. Picornaviridae: вакцинный штамм LSc2ab вируса полиомиелита типа 1 (полиовирус); кишечный цитопатогенный вирус-сирота человека (Enteric Cytopathic Human Orphan — ECHO) типа 11, вариант В, штамм “Каримов”, сибирский, увеатропный и вирус Коксаки В типа 1, прототипный штамм Conn. 5 (вирус Коксаки В1). Эти вирусы отличались по степени цитопатогенности, определенной на чувствительных к ним перевиваемых культурах клеток. Наиболее цитопатогенным был полиовирус (LD_{100}), затем вирус Коксаки В1 (LD_{70}) и последний по степени цитопатогенности — энтеровирус ECHO11 (LD_{10}). В экспериментах использовали вирусосодержащую культуральную жидкость перевиваемых клеток, зараженных вирусами, содержащую 2 Ig титра цитопатогенного действия при 50% гибели клеток ($ТЦД_{50}$). Инкубацию клеток с вирусами проводили в течение 60 мин, после чего для удаления неадгезированных вирусных частиц монослой клеток промывали дважды средой RPMI и продолжали инкубировать до 24 ч.

Оценка динамики накопления вирусного антигена в клетках проводилась непрямой методом флуоресцирующих антител (нМФА). Для этого, монослой клеток фиксировали в 100° охлажденном метиловом спирте при минус $20^\circ C$ в течение 30 с, с целью определения вирусного антигена на фиксированные клетки наслаивали поликло-

нальную сыворотку иммуноглобулинов мыши против использованных для заражения макрофагов вирусов в разведении 1 : 64 и объеме 5–20 мкл. Неспецифическое свечение исключалось путем инкубирования образцов в течение 1 ч в 3% растворе альбумина на основе рабочего буфера. Препараты выдерживали во влажной камере в течение 30 мин в термостате при 37°C, потом промывали рабочим буферным раствором с твином. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигенов вирусов использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 (фирма “Sigma”) против иммуноглобулина мыши IgG1.

Образцы просматривали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ). Для измерений использовали водноиммерсионный объектив ($\times 40$) C – Plan-Apochromat (числовая апертура 1.4), обеспечивающий разрешение около 0.3 мкм в плоскости объектива и около 0.6 мкм вдоль оптической оси объектива при сканирующем возбуждении. Размер конфокальных изображений составлял 1024×1024 вокселей, а время измерения одного изображения – около 25 с. Для регистрации в клетках меченного вирусного антигена использовали возбуждение 543 нм (~20 мкВт на образце, 100%). Световое излучение клеток проходило через одно из трех дихроичных зеркал: NT 80/20, NFT 545; после чего, с помощью дихроичного зеркала NFT 545 и узкополосного фильтра BP 560–615, выделяли спектральный диапазон 560–615 нм, соответствующий эмиссии Alexa Fluor 546. Измеряли спектры флуоресценции образцов, интенсивность свечения выражали в условных единицах, время наблюдения составило до 1 сут.

Определение содержания метаболитов оксида азота (NO) – нитритов (NO_2^-). После инкубирования при 37°C зараженных вирусом клеток надосадок и монослой клеток замораживали и хранили при минус 20°C. К разрушенным макрофагам добавляли по 100 мкл Грисс реактива, который состоял из равных объемов 0.1% N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорида и 1% p-аминобензидин-сульфаниламида (фирма “ICN”), на основе 2.5% -ного раствора фосфорной кислоты [16]. После 10 мин контакта определялась оптическая плотность полученных субстратов на спектрофотометре Multiscan Titertek Plus (“Flow lab.”, Финляндия) при 540 нм. В качестве контроля использовали образцы с раствором субстрата незараженных клеток.

Определение активности АТФазы и 5'-нуклеотидазы. К монослою клеток добавляли по 20 мкл субстрата для АТФазы (8 мг АТФ на 1 мл трис-НСl-буфера pH 7.8, содержавшего 87 мг NaCl, 28.7 мг KCl, 52 мг $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) и 5'-нуклеотидазы (4 мг АМФ на 1 мл такого же буфера, содержащего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl_2), образцы оставя-

ли на 30 и 60 мин [17]. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1 : 1. Через 20 мин оптическая плотность субстратов измерялась на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) использовали метод Лойда в собственной модификации [18].

К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл субстрата для сукцинатдегидрогеназы – метилтиазолилтетразолий бромид (МТТ, 3-[4,5-диметилтиазолил-2]-2,5-дифенил тетразолиум бромид, фирма “ICN”) 2 мг/мл на основе фосфатного буфера pH 7.2 с 0.4% MnCl_2 . Монослой клеток с субстратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0.04 М HCl, в течение 20 мин. Оптическая плотность субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны для лактатдегидрогеназы 492 и сукцинатдегидрогеназы 540 нм. В качестве контроля использовали образцы с раствором субстрата незараженных клеток.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимулирования (Т), который вычислялся, как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных и незараженных вирусами клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для незараженных клеток в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрический анализ клеток, проведенный с помощью лазерной конфокальной микроскопии, показал, что наибольшее количество вирусного антигена ВКЭ определялось в макрофагах, зараженных штаммом Р-69 ВКЭ (рис. 1а). В этих же пределах выявлялось содержание антигена в клетках, инфицированных штаммом Р-202 (рис. 1б), тогда как при заражении клеток вирулентным штаммом ВКЭ Р-73, количество антигенсодержащих клеток статистически достоверно было ниже (рис. 2а). Таким образом, установлено, что наиболее активно макрофаги поглощали слабовирулентные штаммы ВКЭ. В отношении вирусов сем. Picornaviridae наибольшее количество антигена обнаруживалось в образцах клеток, инфицированных энтеровирусом ЕСНО11, затем вирусом Коксаки В1 и полиовирусом (рис. 2б).

Определение активности ферментов плазмалеммы макрофагов, к которым относят 5'-нуклеотидазу (5'-рибонуклеотидфосфогидролаза, КФ 3.1.3.5.), позволяет оценить степень стимулирова-

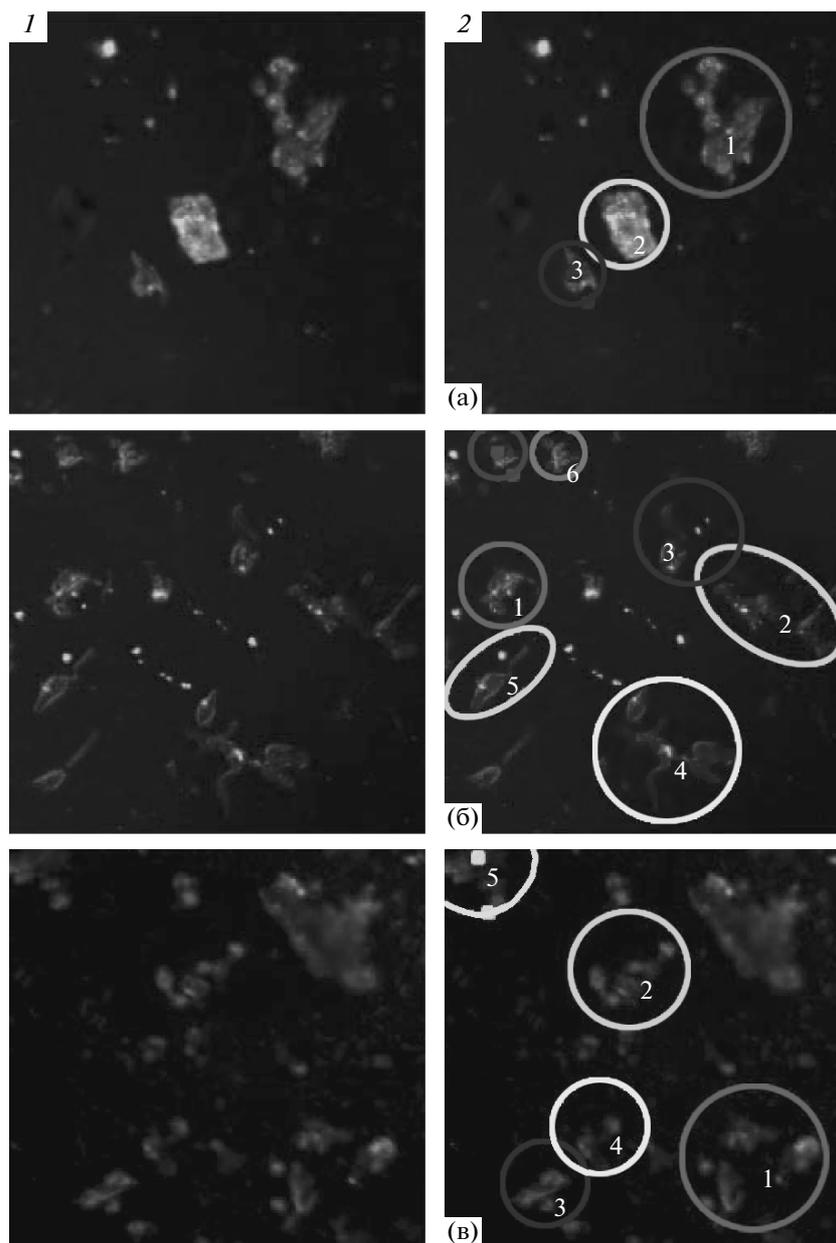


Рис. 1. Лазерная сканирующая микроскопия культуры клеток, зараженных вирусами; а – штаммом ВКЭ Р-69; б – штаммом ВКЭ Р-202; в – штаммом ВКЭ Р-73, 1 ч после заражения, ув. ×800.

1 – специфическое свечение клеток, 2 – области измерения интенсивности флуоресценции.

ния клеток. Нами было выявлено повышение активности фермента в начальные сроки после заражения (4 ч) макрофагов, которые были инфицированы слабовирулентными штаммами ВКЭ Р-69 и Р-202 и энтеровирусом ЕСНО11 (рис. 3а, б). Максимальные значения активности 5'-нуклеотидазы отмечались в клетках, после 3 ч заражения штаммом ВКЭ Р-69. Индекс стимуляции составил $37.2 \pm 2.1\%$. Для животных, инфицированных вирулентным штаммом ВКЭ Р-73, этот показатель был равен $4.5 \pm 0.9\%$. В дальнейшем активность 5'-нуклеотидазы снижалась. Необходимо

отметить высокую активность этого фермента в клетках, зараженных энтеровирусом ЕСНО 11. По-нашему мнению, резкое повышение в начальные сроки инфицирования активности 5'-нуклеотидазы указывает на повышение пуринового обмена в фагоцитах в ответ на внедрение этих вирусов в клетки.

При исследовании активности аденозинтрифосфатазы (АТФаза, КФ 3.6.1.37) обнаружено достоверное изменение внутриклеточного содержания фермента в макрофагах, инфицированных

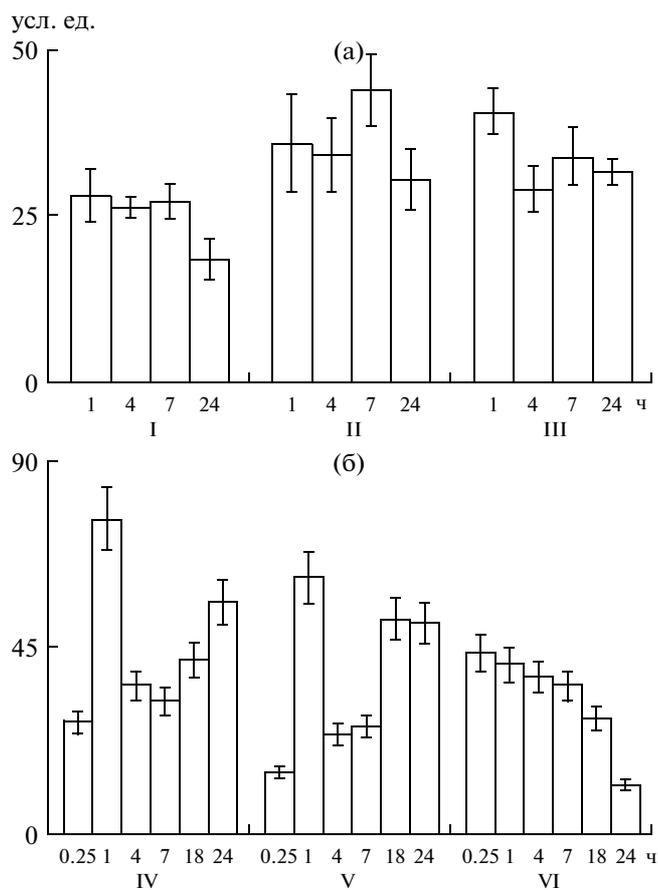


Рис. 2. Интенсивность свечения (усл. ед.) антигена ВКЭ (а) и вирусов сем. Picornaviridae (б) в условных единицах в зависимости от срока инкубирования (ч). I – штамм ВКЭ Р-73; II – штамм ВКЭ Р-69; III – штамм ВКЭ Р-202; IV – Коксаки В1; V – полиовирус; VI – энтеровирус ЕСНО 11.

слабовирулентными штаммами ВКЭ и энтеровирусом ЕСНО11 (рис. 3в, г). Необходимо отметить, что при контакте с энтеровирусом ЕСНО11 в макрофагах в течение всего периода наблюдения обнаруживались, по сравнению с клетками, инфицированными остальными вирусами, максимальные значения активности АТФазы. Индекс стимулирования после 3 ч инкубирования достигал $24.7 \pm 1.6\%$. Таким образом, полученные данные по активности АТФазы указывают на выраженное стимулирование макрофагов в ответ на заражение вирусами, обладающими сниженным цитопатогенным действием на клетки.

Наблюдаемое нами повышение внутриклеточного содержания ферментов макрофагов, которые обычно расходуются клетками при различных пространственных преобразованиях плазмалеммы, связано с репродукцией вирусов. Известно, что в течение процесса репликации вирусов многих семейств обнаруживается ингибирование экспрессии генов клетки-хозяина [19]. Одной из при-

чин этого считают образование в ресурсах клеток высокого уровня ферментов, таких, как нуклеозид трифосфатаз и нуклеотидаз, используемых при синтезе вирусных компонентов. Причем нуклеозидтрифосфаты, которые синтезируются при участии 5'-нуклеотидаз, служат строительными блоками для вирусной РНК или функционируют в качестве коферментов. Наряду с этим цитоплазматическая область АТФазы принимает участие в реакционном цикле фосфорилирования (дефосфорилирования) при переносе синтезированных нуклеотидов. Вероятно, увеличение показателей внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидазы и АТФазы в зараженных вирусами макрофагах отражает наличие синтеза вирусных нуклеотидов в фагоцитах.

Для определения цитотоксического действия инфекционных агентов на клетки используется тест, основанный на уменьшении количества метилтиазолилтетразолия бромид (МТТ), включенного в клетки. Преобразование МТТ в формазан происходит с помощью сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.5.1) митохондрий, отражающих жизнеспособность клеток.

В течение 1 сут после заражения, по сравнению с контролем, установлено понижение активности СДГ в макрофагах, зараженных ВКЭ, энтеровирусом Коксаки В1 и полиовирусом (рис. 4а). Различие между показателями активности этого фермента в клетках, зараженных штаммами ВКЭ, отличающимися по степени вирулентности, статистически было недостоверным. Необходимо отметить, что достоверное повышение внутриклеточного содержания СДГ выявлялось только в макрофагах, зараженных энтеровирусом ЕСНО 11. Так, после 2 ч инкубирования индекс стимулирования достигал значения $36.1 \pm 1.7\%$, после чего снижался и вновь повышался к концу срока наблюдения ($42.3 \pm 1.8\%$). Напротив, количество этого фермента в макрофагах, зараженных энтеровирусом Коксаки В1, находилось в пределах контрольных значений, а в клетках, инфицированных полиовирусом и ВКЭ, снижалось. Минимальные показатели выявлялись через 4 ч после заражения и составили -7.8 ± 0.5 и -20 ± 1.7 соответственно, что указывало на цитотоксическое действие этих вирусов.

В литературе последних лет особое значение в ряде кислородзависимых метаболитов, помимо активных форм кислорода, придается нитроксидным радикалам. При этом указывается на то, что уровень продукции активных форм NO в этих клетках коррелирует с такими классическими критериями стимулирования, как усиленная продукция активных форм кислорода и микробицидность. Нестабильность и высокая реакционная способность молекулы оксида азота (NO) являются главными причинами методических трудно-

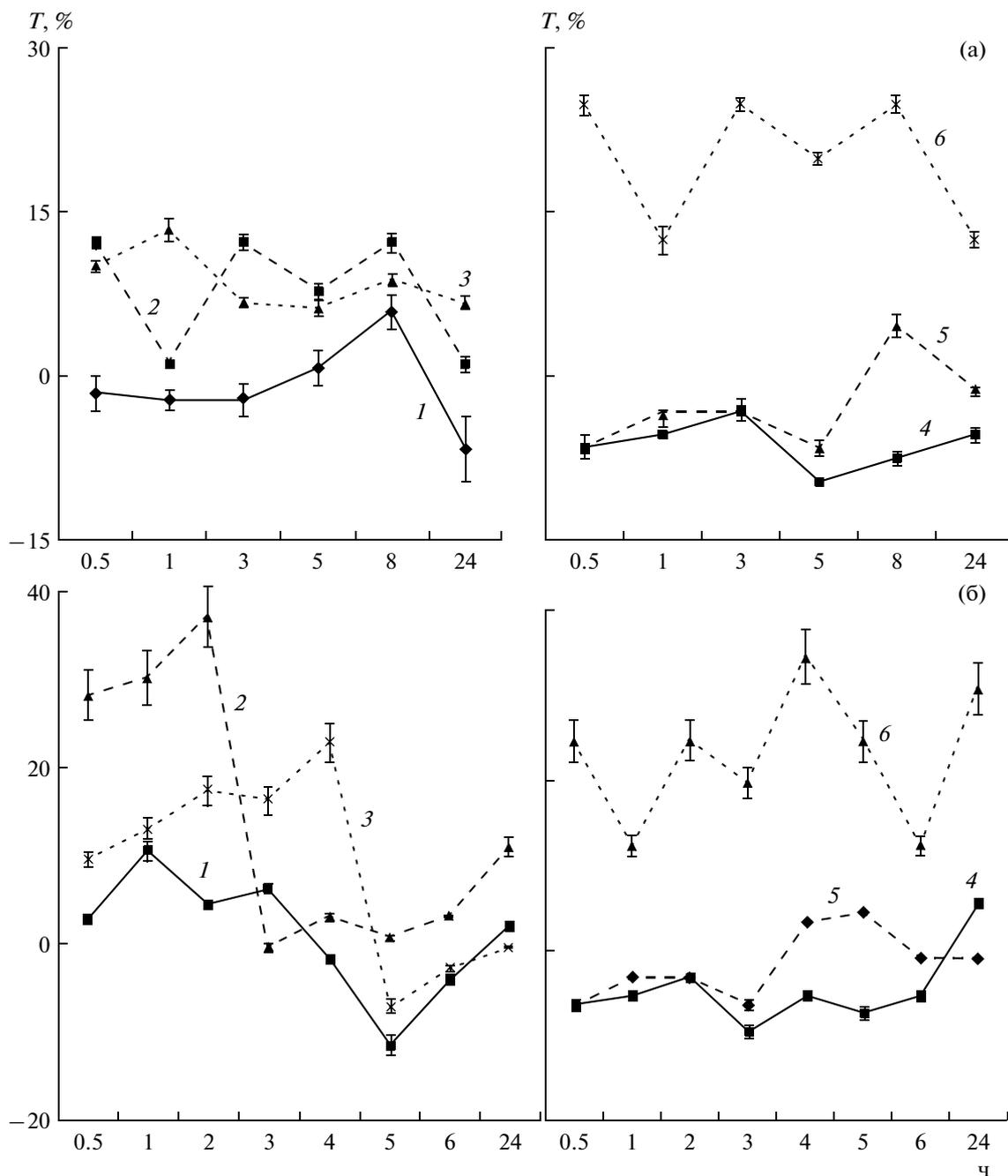


Рис. 3. Активность ферментов 5'-нуклеотидазы (а) и АТРазы (б) в макрофагах, зараженных вирусами. По оси ординат Т – индекс стимулирования в процентах.

1 – штамм ВКЭ Р-73; 2 – штамм ВКЭ Р-69; 3 – штамм ВКЭ Р-202; 4 – Коксаки В1; 5 – полиовирус; 6 – энтеровирус ЕСНО 11.

стей при его количественной оценке. Для исследования активности нитроксидзависимой системы макрофагов, инфицированных вирусами, мы использовали метод косвенного выявления нитрит-аниона при помощи реактива Грисса.

При изучении функциональной активности макрофагов установлено, что содержание метаболитов NO, по сравнению с показателями для не-

зараженных клеток, повышалось через 2 ч после инфицирования вирусами (рис. 4б). В этот период индекс стимулирования для клеток, зараженных вирулентным штаммом Р-73, составил $0.9 \pm 0.1\%$, тогда как для макрофагов, инфицированных слабовирулентными штаммами Р-69 и Р-202 – $6.7 \pm 0.4\%$ и $1.78 \pm 0.1\%$ соответственно. В дальнейшем показатели содержания метаболитов NO в

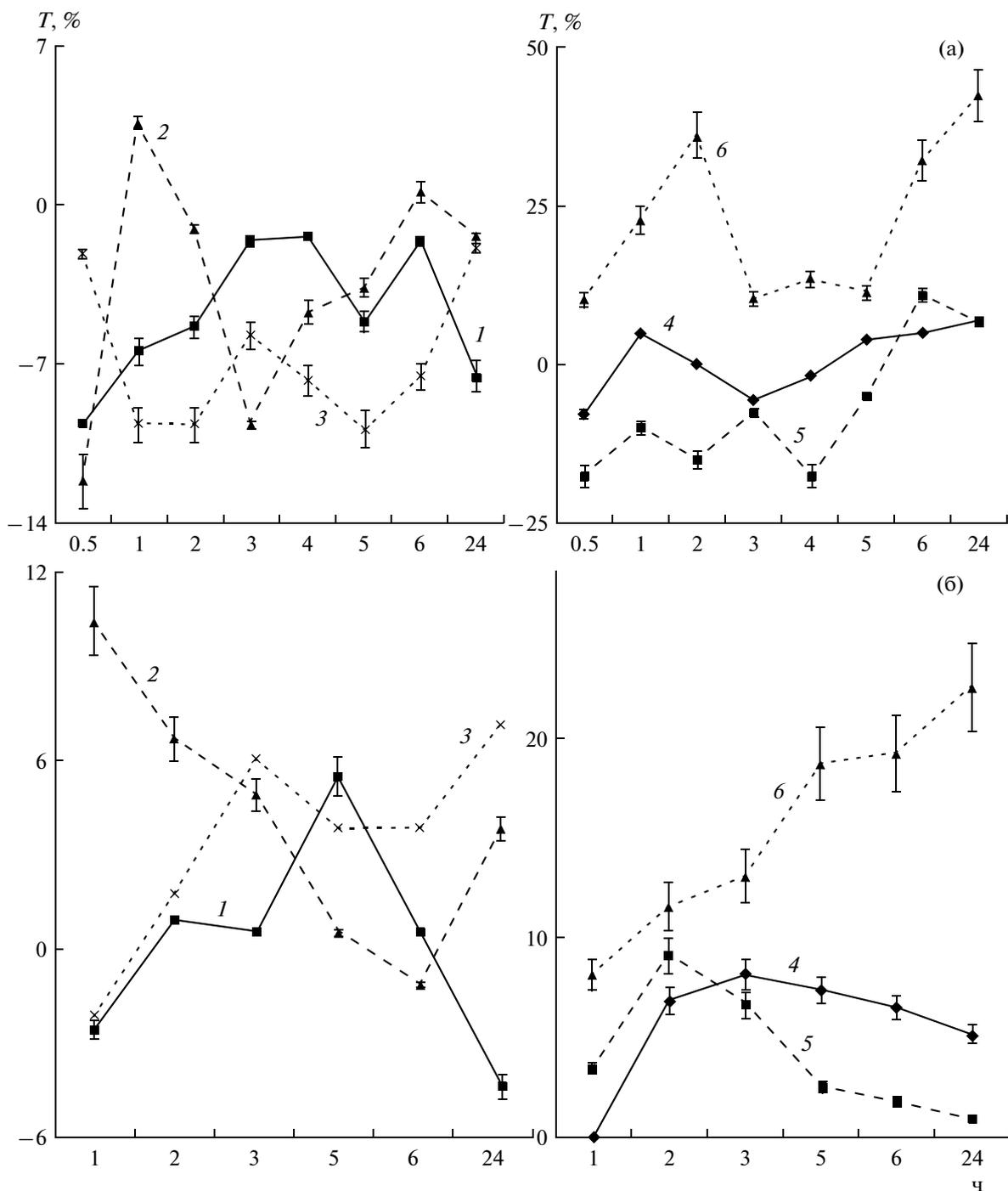


Рис. 4. Активность ферментов сукцинатдегидрогеназы (а) и продукции оксида азота (б) в макрофагах, зараженных вирусами. По оси ординат Т – индекс стимуляции в процентах.
 1 – штамм ВКЭ Р-73; 2 – штамм ВКЭ Р-69; 3 – штамм ВКЭ Р-202; 4 – Коксаки В1; 5 – полиовирус; 6 – энтеровирус ЕСНО 11.

макрофагах, зараженных слабовирулентными штаммами ВКЭ, превышали таковые для клеток, инфицированных вирулентным штаммом Р-73 почти в 2 раза. Таким образом, максимальная NO-образующая активность клеток выявляется в

начальные сроки после заражения и зависит от свойств раздражающего агента. Интерес представляют также данные исследования содержания метаболитов NO в макрофагах, инфицированных энтеровирусами и полиовирусом. Повы-

Показатели индекса реактивности клеток (ИРК), зараженных вирусами

ИРК, зараженных штаммами вирусов	Ферменты			Метаболиты оксида азота NO	ИРК _{ср}
	АТФаза	5'-нуклеотидаза	сукцинатдегидрогеназа		
ВКЭ Р-73	99	99	91	99	97
ВКЭ Р-69	120	108	100	116	111
ВКЭ Р-202	110	109	101	109	107
Энтеровирус Коксаки В1	94	91	100	100	96
Полиовирус	97	91	93	93	93
Энтеровирус					
ЕСНО11	120	114	122	109	116

шение количества нитритов отмечалось в начальные сроки инкубирования, снижаясь в последующем в макрофагах, зараженных энтеровирусом Коксаки В1 и полиовирусом, и повышаясь в клетках, контактировавших с энтеровирусом ЕСНО 11.

С целью оптимизации оценки цитотоксического действия вирусов на макрофаги нами был использован индекс реактивности клеток (ИРК) в условных единицах. Этот показатель вычисляется на основании значений оптической плотности субстратов в цитохимических реакциях, связанных с изменением функциональной активности клеток после воздействия на них вирусов. ИРК равен соотношению среднеарифметического показателя активации клеток (ПАК), зараженных вирусом, к аналогичному показателю для незараженных макрофагов, умноженном на 100. Целую часть значений ИРК, полученных по каждому параметру функциональной активности, суммировали, делили на количество ИРК и выражали в условных единицах. Суммарное определение ИРК_{ср} (по временным промежуткам и 4 параметрам реактивности клеток) четко показывает различие в степени цитопатогенности вирусов (таблица), тогда как сравнение отдельных значений ИРК не дает возможности в полной степени судить об этом. На предложенный нами показатель был оформлен патент на изобретение “Способ определения степени цитопатогенности вирусов” и получен приоритетный номер № 2011112215 от 30.03.2011.

На модели *in vitro* при заражении макрофагов различными видами вирусов, а также штаммами ВКЭ, отличающимися по степени вирулентности, нами была проверена целесообразность применения разработанного критерия. Из представленной таблицы видно, что наибольшим цитопатогенным действием обладали полиовирус (93 усл. ед.), затем энтеровирус Коксаки В1 (96 усл. ед.) и высоковирулентный штамм ВКЭ Р-73 (97 усл. ед.). Меньшей степенью цитопатогенности обладали энтеровирус ЕСНО 11 (116 усл. ед.) и слабовиру-

лентные штамм ВКЭ Р-69 и Р-201 (111 и 107 усл. ед. соответственно).

Таким образом, предложенный нами показатель, позволяет выразить реагирование макрофагов в цифровых результатах, что более точно отражает воздействие вирусов на клетки, так как степень цитопатогенности вирусов определяется на основании цитохимической реакции клеток в ответ на заражение с привлечением инструментального объективного подсчета данных, что позволяет оценить цитопатогенность вирусов в условных единицах. Возможность одновременного определения в одном образце ряда параметров, а также объективность учета результатов с помощью спектрофотометрии позволяет дать комплексную оценку функционального состояния клеток, инфицированных вирусами, и с помощью показателя ИРК_{ср} судить о степени цитопатогенности конкретного вируса. Данная модель проста в постановке, легко воспроизводима и позволяет в короткие сроки (до 1 сут), определить цитопатогенность вирусов.

Зависимость функциональной активности клетки от вирулентных свойств вирусов была показана и другими авторами. Так, при заражении макрофагов слабовирулентным, не способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом полиовируса, было определено, что количество клеток, содержащих вирусный антиген, было выше, чем в случае инфицирования высоковирулентным, способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом [20]. Анализ результатов ультраструктурного исследования макрофагов, зараженных Бразильскими флавивирусами (желтая лихорадка, Росио, Бассаквара и вируса Сан Луи энцефалита), выявил цитопатологические изменения после 3 сут инфицирования [21]. Эти изменения были однотипными при заражении клеток разными вирусами и выражались преимущественно в гипертрофии полостей гладкой и шероховатой эндоплазматической сети, увеличении количества свободных рибосом. При изучении функцио-

нальной активности макрофагов, зараженных указанными вирусами, была обнаружена зависимость продукции ими цитокинов (интерлейкин 1 β , фактор некроза опухоли α , фактор трансформации роста β , интерферон 1 α) и оксида азота (NO) от вида вируса, использованного для инфицирования клетки [22]. Авторами был сделан вывод о селективной способности тестируемых Бразильских флавивирусов регулировать синтез макрофагами цитокинов и NO. В отношении ВКЭ было показано, что макрофаги более чувствительны к нейроинвазивному вирулентному для мышей штамму [23]. Однако при этом с помощью электронной микроскопии не были определены морфологические изменения клеток, связанные с их активацией. Вирусные частицы преимущественно локализовались в эндоплазматической сети и других цитозольных структурах клеток, тогда как при заражении макрофагов ослабленным, не способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом на фоне отсутствия репродукции ВКЭ обнаруживались четко выраженные морфологические изменения, свидетельствующие о стимулировании клеток.

Таким образом, основываясь на литературных и собственных данных, можно сделать вывод о зависимости реакции макрофагов не только от вида вирусов, которыми они были инфицированы, но и от их вирулентных свойств. Анализ результатов нашего исследования метаболической активности макрофагов, зараженных вирусами, показывает, что период активации генома вируса в цитоплазме клетки-хозяина сопровождается первоначальным повышением активности клеточных ферментов, а период транскрипции РНК вируса и синтез его компонентов совмещен с наибольшей ферментативной активностью макрофагов. При этом, учитывая, что биосинтез компонентов вирусной частицы осуществляется с участием ферментов клетки-хозяина, то статистически достоверный сдвиг подобной активности может рассматриваться как показатель цитопатогенного воздействия вируса на клетки.

В целом, применение высокочувствительных методов определения активности ферментов и выявление корреляционной связи между ее изменениями и особенностями взаимодействия вирусов с клетками можно отнести к важным способам идентификации не только репродукции вирусов, но и дифференцировки типов их цитопатогенного действия, а также разграничения его степени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (государственный контракт 4006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрейдлин И.С. Система моонуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984. 272 с.
2. Маянский Д.Н., Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 344 с.
3. Тоголян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб: Наука, 2000. 232 с.
4. Barbosa C.M., Leon C.M., Nogueira-Pedro A., Wasinsk F., Araújo R.C., Miranda A., Ferreira A.T., Paredes-Gameiro E.J. // Cell Death Dis. 2011. V. 2. № 2. P. e165.
5. Ziegler-Heitbrock H.W. // J. Leukoc. Biol. 2000. V. 67. № 4. P. 603–606.
6. Mizuno K., Toma T., Tsukiji H., Okamoto H., Yamazaki H., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S., Yachie A. // Clin. Exp. Immunol. 2005. V. 142. № 2. P. 461–470.
7. Cooper E.L. // Cur. Pharmaceut. Des. 2002. V. 8. № 4. P. 99–110.
8. Temonen M., Lankinen H., Vapalahti O., Ronni T., Julkunen I., Vaehri A. // Virol. 1995. V. 206. № 1. P. 8–15.
9. Siczekarski S.B., Whittaker G.R. // Traffic. 2003. V. 4. № 5. P. 333–337.
10. Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R. // J. Virol. 1999. V. 73. № 5. P. 3951–3959.
11. Schlegel A., Giddings T.H. Jr., Ladinsky M.S., Kirkegaard K. // J. Virol. 1996. V. 70. № 5. P. 6576–6588.
12. Fang F.C., Vazquez-Torres A. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2002. V. 282. № 5. P. 941–943.
13. Amano F., Noda T. // FEBS Lett. 1995. V. 368. № 3. P. 425–428.
14. Jourdeuil D., Jourdeuil F.L., Kutchukian P.S., Musah R.A., Wink D.A., Grisham M.B. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 7. P. 28799–28805.
15. Рейтов В.П. // Вестн. Рос. Акад. мед. наук. 2000. Т. 4. № 3. С. 35–41.
16. Schulz K., Kerber S., Kelm M. // Nitric Oxide. 1999. V. 3. № 3. P. 225–234.
17. Кириллчева Г.Б., Кириллчева А.А., Туманян М.А. // Иммуномодуляторы в инфекционной патологии. М.: Изд-во НИИЭМ, 1988. С. 55–56.
18. Лойда З., Госсрай Р., Шублер Т. Гистохимия ферментов лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.
19. Knipe D.M. Fundamental Virology / Eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, Philadelphia: a Lippincott-Raven Publishers, 1996. P. 239–265.
20. Freistadt M.S., Eberle K.E. // J. Virol. 1996. V. 70. № 9. P. 6486–6492.
21. Barros V.E., Thomazini J.A., Figueiredo L.T. // J. Microsc. 2004. V. 216. № 1. P. 5–14.
22. Barros V.E., Ferreira B.R., Livonesi M., Figueiredo L.T. // Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 2009. V. 51. № 3. P. 141–147.
23. Růžek D., Vancová M., Tesarová M., Ahantarig A., Kopecký J., Grubhoffer L. // J. Gen. Virol. 2009. V. 90. № 7. P. 1649–1658.

Biochemical Markers of Virus Cytopathogenicity in Macrophages

N. G. Plekhova^b, L. M. Somova^a, N. V. Krylova^a, G. N. Leonova^a, I. N. Lyapun^a, and I. S. Smirnov^b

^a *Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, 690087 Russia*

^b *Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950 Russia*

e-mail: pl_nat@hotmail.com

Received September 27, 2011

Abstract—The results of macrophage metabolism studies at their infection by viruses differing in the level of virulence are presented. With the purpose of optimizing the estimation of viral cytopathogenic effects on macrophages, an index of cell reactions, which allows one to reveal the degree of virus influence in standard units, is offered. Generally, the application of high-sensitivity methods for functional activity determination and identification of the correlative communication between its changes and morphological features of cells can be prescribed to objective identification methods of not only viral reproduction, but also differentiation of types and the degree of their cytopathogenic effects.