

В. Г. АЙРАПЕТЯН, К. Е. АБЕЛЯН, Дж. К. КАРАПЕТЯН

К ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

О морфологии и онтогенезе вируса болезни Ауески в доступной нам литературе имеется лишь несколько сообщений.

В 1952 году Реаген и др. электронномикроскопически установили наличие вирусных частиц в клетках мозга собаки. Было доказано морфологическое сходство вируса Ауески и Herpes-Simplex [4, 6]. Недавно вышедшая работа А. Ф. Быковского и др. [2] также говорит о одинаковом морфологическом строении этих вирусов. К этой группе относят и вирус ларинготрахеита — LT [7]. Все эти вирусы обладают общими морфологическими признаками и сходной организацией. Рейсинг и Каплан [6] показали, что неполные вирусные частицы, полученные путем воздействия 5-флуороурацила на зараженную клетку, в отличие от инфекционных (т. е. зрелых) вирусных частиц лишены нуклеоида.

В данной работе приводятся некоторые данные относительно онтогенеза вируса болезни Ауески в культуре ткани почек крольчат.

Материал и методы. Культура ткани. Однослойная культура ткани почек новорожденных (5—15-дневных) крольчат (ПК) была получена от трипсинизированной (в 0,25% растворе трипсина) почечной ткани в сбалансированном солевом растворе Хенкса, содержащем 0,5% гидролизата лактальбумина и 10% бычьей сыворотки. Культуру ткани выращивали в чашках Петри диаметром 5—6 см.

Вирус. Использован вирус болезни Ауески, выделенный от павшего поросенка в ГНИИ и пассажированный на культуре ткани клеток ПК, аспирантом лаборатории вирусологии М. Чобаняном. В настоящей работе использован культуральный вирус 216 пассажа. Для данной культуры ткани вирус имел титр ЦПД₅₀ = $5 \cdot 10^{-7}$ и ЛД₅₀ = 10^{-6} для кроликов. Однослойную культуру ткани ПК заражали вышеуказанным вирусом в дозе 0,2 мл, предварительно слив культуральную жидкость. Равномерно распределив вируссодержащую жидкость по поверхности культуры ткани, чашки Петри ставили в термостат при 37°C в течение 30 минут для контакта вируса с клетками, затем культуру промывали и в каждую чашку добавляли по 5—7 мл среды Хенкса без сыворотки.

Приготовление электронномикроскопических препаратов. Зараженные культуры ткани в чашках Петри через 1, 3, 5, 10, 12, 16 и 24 часа снимали из термостата, сливали культуральную жидкость, а ткань фиксировали 1%-м забуференным раствором четырехоксида осмия (по Шестрауду) при pH = 7,2—7,4 в течение 25—30 минут при температуре 4°C.

Обезвоживание проводили при комнатной температуре в спиртах посходящей концентрации: 30, 50, 70, 80, 96° по 3 минуты в каждом (некоторые препараты были оставлены в 70° спирте на ночь) и в трех порциях абсолютного спирта по 3—4 минуты. Обезвоженную культуру ткани проводили через смесь бутил + метилметакрилат без катализатора (перекись бензонла), а затем через эту же смесь, но с катализатором — по 3 минуты. Заключение культуры ткани в предварительно сваренный предполимер (бутилметакрилат + метилметакрилат + перекись бензонла в соотношениях 4 : 1 : 0,05) проводили в металлических кольцах по Быковскому [3] и поместили в термостат при температуре 58°C. Участки монослоя для приготовления блоков и получения ультратонких срезов выбирали при помощи фазово-контрастного микроскопа. Ультратонкие срезы получали на ультратомах УМТ-2 и ЛКВ*, контрастировали раствором уранилацетата и просматривали в электронных микроскопах ЭМ-7 и JEM-6C* при увеличениях на экране 2400, 10 000, 25 000 и 40 000 х.

Результаты и обсуждение. Вирус болезни Ауески, как и многие другие вирусы, проникает в клетку в результате рефеоцитоза, не претерпевая субмикроскопических изменений. В течение первых 8—9 часов после проникновения вируса обнаружить его в клетке не удается (рис. 1). По-видимому, в этот период происходит дезинтеграция вирусной частицы, затем до появления новой генерации проходит эклипсая фаза.

Первые зачатки формирования виропласта или вирусного «матрикса» мы обнаруживали через 9—10 часов после заражения клетки. К этому сроку в ядре клетки возникают области, заполненные осмиофильным материалом, часть которых имеет гранулярную структуру, а часть — хаотически расположенные фибриллы толщиной около 30 Å, соответствующей толщине нуклеиновой кислоты (рис. 2). На рис. 2 можно видеть участок фибриллярной массы «матрикса» и «кристаллоподобное» скопление формировавшихся незрелых вирусных частиц.

Дальнейшее развитие вируса происходит следующим образом. Появляются оболочки полукруглой формы, затем концы оболочек смыкаются и с этого момента вирус изолируется от компонентов клетки. В них появляется нуклеоид (рис. 2). Это наше наблюдение совпадает с развитием вируса натуральной оспы, описанным А. А. Авакяном и А. Ф. Быковским [1].

Первичный нуклеоид вначале примыкает к внутренней оболочке и как бы выталкивается из нее. В последующем он увеличивается в размере, отделяется от оболочки и перемещается в центр вироспоры (рис. 3). Эти стадии развития вируса происходят в ядре клетки. Незрелые вироспоры образуют внутриядерное «кристаллоподобное» скопление (рис. 2 и 3). Пока детально не выяснены причины и закономерности ориентации вирусных частиц в образовании «кристаллоподобных» скоплений. Вирусные частицы в ядре имеют более простое строение, срав-

* Работа на ультрамикротоме ЛКВ и на электронном микроскопе JEM-6C проводилась в лаборатории морфологии микроорганизмов ИЭМ им. Гамалеи.



Рис. 1. Ультратонкий срез клетки через 8—9 часов после заражения вирусом болезни Ауески.

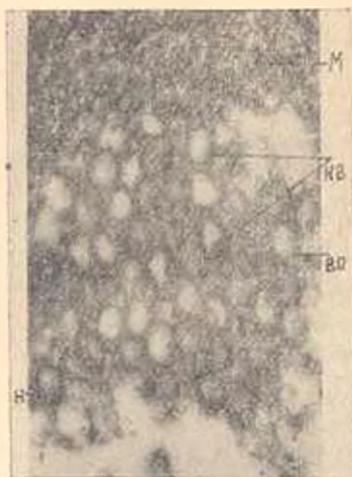


Рис. 2. Вирусный «матрикс» и формирование незрелых вирусных частиц в «кристаллоподобной» упаковке.



Рис. 3. «Кристаллоподобное» скопление незрелых вирусных частиц с центральным расположением нуклеоида.

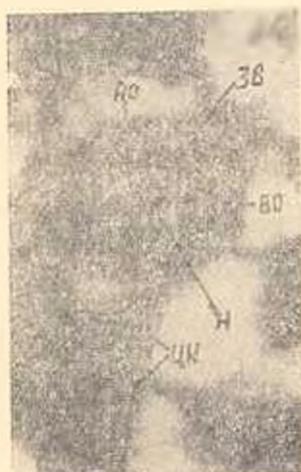


Рис. 4. Зрелая вирусная частица в цитоплазме.

Я — ядро, ОЯ — оболочка ядра, МХ — митохондрии, М — матрикс, НВ — незрелый вирус, ВО — внутренняя оболочка, Н — нуклеоид, ЗВ — зрелый вирус, НО — наружная оболочка, ЦК — цитоплазма клетки, Ф — фагосома, МФ — мембрана фагосомы.



Рис. 5. „Звездчатая“ форма клетки. Иммунофлуоресценция.

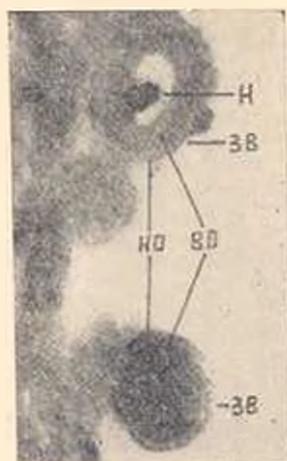


Рис. 6. Зрелая вирусная частица в момент выхождения из клетки.

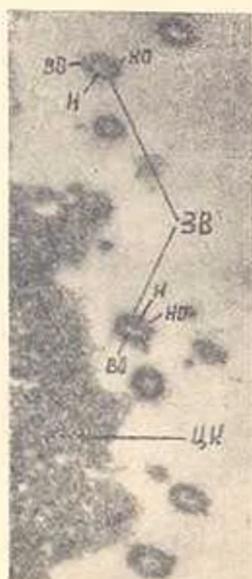


Рис. 7. Вирусные частицы, вышедшие за пределы клетки.

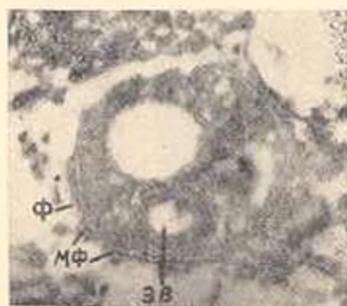


Рис. 8. Зрелая вирусная частица, заключенная в цитоплазму (фагосома).

нительно малые размеры (1000—1200 А°) и находятся в большом количестве.

Вскоре, по истечении 10—12 часов после заражения, новообразованные вирусные частицы «покидают» ядро и проникают в цитоплазму (рис. 4). Проходя через ядерную мембрану, вирус приобретает вторую оболочку (наружную). Как видно на рис. 4, в цитоплазме он состоит из нуклеоида и мембран: первичной или внутренней оболочки (капсида) и наружной оболочки. В цитоплазме концентрация вирусных частиц не достигает такой степени, как в ядре. Это объясняется его быстрым выходом из клетки, которое сопровождается разрывом клеточной оболочки и распадом цитоплазмы во многих участках клетки. В результате этого клетка теряет свою нормальную конфигурацию и принимает «звездчатую» форму, как это видно на рис. 5, полученном методом иммунофлуоресценции.

Весь этот процесс развития вируса болезни Ауески, от начала проникновения вируса в клетку и до образования новой генерации зрелых вирусных частиц и их выхода из клетки, длится 16—18 часов. На рис. 6 видны зрелые вирусные частицы в момент выхода из клетки. Неудлиненное изображение этих частиц и нечеткость разграничения оболочек у некоторых из них объясняется разностью плоскости среза на ультрамикротоме. На внутренней оболочке зрелого вируса видны гранулированные образования — капсомеры (субъединицы). На рис. 7 видно множество вирусов, вышедших за пределы клетки. Зрелый вирус достигает размеров от 1500 до 1800 А°. Некоторое различие в данных о величине этого вируса следует отнести за счет метода исследования.

Особый интерес представляет рис. 8. Здесь зрелая вирусная частица заключена в определенно разграниченный мембраной участок цитоплазмы с вакуолизированным пространством («фагосома»). Подобное изображение встречается редко и притом в единичных, сравнительно целых клетках, через 24 часа после заражения, когда все окружающие клетки давно разрушены от цитопатогенного действия размножающихся вирусных частиц.

Таким образом, наши исследования показывают, что вирус болезни Ауески, проникший в клетку культуры ткани в результате рофеоцитоза, в течение первых 8—9 часов не обнаруживается. Затем в ядре клетки появляются первые стадии образования виропласты или вирусного «матрикса», из которого формируются незрелые вирусные частицы, находящиеся в «кристаллической» упаковке. Наружную оболочку вирус приобретает, проходя через ядерную мембрану. В цитоплазме формируются зрелые вирусные частицы, которые вскоре покидают клетку, разрушая ее во многих местах. Весь этот процесс длится 16—18 часов с момента заражения клетки культуры ткани. Размер зрелых вирусных частиц достигает 1500—1800 А°.

Վ. Գ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Կ. Ե. ԱՐԵՎՅԱՆ, Զ. Կ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԱՅԻՆ ԿՈՒՆՏՐՈՒԱՅՈՒՄ ԱՌԻՍՍԿԻ ՀԻՎԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ՎԻՐՈՒՄԻ ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՄԵՐՈՍԿՈՊԻԿ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՇՈՒՐՁԸ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Աուենկի հիվանդության վիրուսի անտոգենեզի ուսումնասիրությունը կատարվել է հյուսվածքային կուլտուրայի մեջ նրա զարգացման ընթացքում, ուլտրաբարակ կտրվածքների մեթոդի կիրառմամբ:

Մեր ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Աուենկի հիվանդության վիրուսը առֆեոդոտոզի հատանքով բջիջը ներթափանցելուց հետո առաջին 8—9 ժամվա ընթացքում չի հայտնարեբվում: Այնուհետև բջիջի կորիզի մեջ հայտնարեբվում է վիրուսյաստի կամ վիրուսային ամառիբուր՝ առաջացման սկզբնական ստադիան: Վիրուսյաստից զոչանում են չհասունացած վիրուսային մասնիկները բյուրեղային դասավորությամբ: Բջիջի կորիզից դուրս դալու ժամանակ վիրուսը ձևոր է քերում իր արատրին թաղանթը:

Ֆրաուլազմայում ձևավորվում են հասուն վիրուսային մասնիկները, որոնք շուտով դուրս են գալիս բջիջից, բայրալիով նրան տարրեր կետերից: Այդ ամբողջ պրոցեսը տևում է 16—18 ժամ, սկսած հյուսվածքային կուլտուրայի վարակման մոմենտից: Աուենկի հիվանդության հասուն վիրուսի մեծությունը հասնում է մինչև 1500—1800 \AA -ի:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авакян А. А., Быковский А. Ф. Актуальные вопросы вирусологии. Изд. Медицина, 1965.
2. Быковский А. Ф., Базылев П. М., Прохорова Э. М. Ветеринария, 12, стр. 13—15, 1961.
3. Быковский А. Ф. Вопросы вирусологии, 4, 1961.
4. Kaplan A. S., and Vatter A. E. Virology 7, 394, 1959.
5. Reagen R. G., Schenk D. M., Harmon M. P. and Brueckner A. L. Am. J. Vet. Res. 13, 577, 1952.
6. Reissing and Kaplan A. S. Virology, v. 16, 1, 1—7, 1962.
7. Wairach A. M., Hauson L. E. and Wairach M. A. Virology v. 21, 1, 601—608, 1963.