

УДК 619.4:616.988.13

Н. У. НАДЖАРЯН, В. И. ГЕВОРКЯН, Э. А. МОВСЕСЯН,
Շ. Տ. ՇՄՄԱՐԻՅԱՆ, Լ. Ա. ԿԱՄԱԼՅԱՆ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА С КЛЕТКАМИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ ПОЧКИ ЭМБРИОНА СВИНЬИ

Поставлена задача выяснить ряд вопросов, касающихся герпетической инфекции, а именно: условия ее формирования, механизм длительной персистенции вирусов и состояние латентного вируса. При решении этих вопросов авторы пользовались одним из современных методов исследований—методом клеточных культур, в частности перевиваемыми линиями почки эмбриона свиньи, амниона человека, первичной культурой фибробластов эмбриона человека.

Вирус простого герпеса хорошо размножается в культурах, полученных из нормальных и опухолевых тканей человека и животных. В связи с этим клеточные культуры являются удобной моделью для исследования различных аспектов взаимодействия этого вируса с клеткой. Поскольку для герпес-вирусов, в том числе и вируса простого герпеса, характерна длительная персистенция в организме, которая при наличии определенных условий может способствовать неопластической трансформации клеток, изучение условий и механизмов формирования хронической и герпетической инфекций *in vitro* является актуальным.

Широко используемой моделью для изучения механизмов хронической герпетической инфекции является культура ткани, где она воспроизводится с помощью различных методов [1—6]. В культурах, где вирус простого герпеса (ВПГ) репродуцируется без деструкции клеток, латентная инфекция развивается чаще и легче. Поэтому такие культуры могут служить удобной системой для выяснения ряда вопросов латентной герпетической инфекции, как например: условий формирования ее, механизма длительной персистенции вирусов и состояния латентного вируса.

Целью настоящей работы является исследование 1) особенностей репродукции различных серотипов ВПГ в клетках эмбриона свиньи и 2) характеристики обусловленной ими хронической герпетической инфекции.

Материал и методы

Культура ткани: в опытах использованы клетки перевиваемых линий амниона человека (FL), почки эмбриона свиньи (СПЭВ), а также

первичная культура фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки всех культур выращивали в смеси равных объемов среды 199 и гидролизата лактальбумина с 10% бычьей сыворотки. Пассажи клеток перевиваемых линий культур проводили через каждые 4—5 дней, клетки снимали 0,02% раствором версена. Использовано 6 штаммов вируса, из них 2 штамма эталлонных (американских)—HSV-1 и HSV-2 и 4 местных, выделенных от больных с фациальным герпесом (ВГФ-1 и ВГФ-2) и с герпесом гениталий (ВГГ-2 и ВГГ-3). Все 4 штамма выделены в клетках ФЭЧ и идентифицированы в реакции нейтрализации на культуре ткани с помощью иммунных сывороток к эталлонным штаммам ВПГ—HSV-1 и HSV-2. Вирусы поддерживались в лаборатории путем пассажей на клетках ФЭЧ. Титры (в lg_{10} ТЦД₅₀/мл) вирусов I серотипа в культуре ФЭЧ составили 5,0—6,0, вирусов II серотипа—3,0—5,0.

Результаты

1. Особенности репродукции различных серотипов ВПГ в клетках СПЭВ

Клетки перевиваемой культуры—СПЭВ были заражены 5 штаммами I и II серотипов ВПГ (HSV-1, HSV-2, ВГФ-1, ВГФ-2 и ВГГ-3). Все штаммы вируса простого герпеса, за исключением ВГГ-3, репродуцировались в клетках СПЭВ без выраженного цитопатического действия (ЦПД) в течение 2 недель с момента заражения. Поэтому о степени репродукции вирусов судили по результатам титрования сливов культуральной жидкости с зараженных клеток СПЭВ на чувствительной культуре FL. К клеткам FL были чувствительны все использованные штаммы вируса (3—серотипа I и 3—серотипа II).

Характер цитопатического действия изученных штаммов ВПГ в клетках FL был одинаков и не изменялся в процессе последовательных пассажей. Все изученные вирусы прошли на клетках 9—11 пассажей. Необходимо отметить, что при первичном заражении культуры FL вирусами, адаптированными к клеткам ФЭЧ, титры всех штаммов ВПГ значительно снижались (на 2—3 lg), однако в дальнейшем, по мере пассирования, титры вирусов I и II типов возрастали и после 6—7 пассажей существенно не отличались от титров, отмечаемых в клетках ФЭЧ. Штаммы, относящиеся к серотипу I, в клетках FL репродуцировались лучше (титры—5—6 lg), чем штаммы ВПГ серотипа II (3—4 lg).

Изучение динамики репродукции вирусов I и II типов в клетках FL при заражении культуры штаммами серотипа I (ВГФ-1) и серотипа II (ВГГ-3) в дозе 100 ТЦД₅₀ показало, что в обоих случаях инфекционный вирус обнаруживался в культуральной среде спустя 6—9 часов в невысоких титрах (1—2 lg), через 24 часа титры вирусов достигали для ВГФ-1—4 lg и для ВГГ-3—3 lg, максимальные титры соответственно отличались на 3—4-й дни—6 и 4 lg, на 5—6-й дни имело место некоторое снижение титров (на 1—2 lg).

Для выяснения степени репродукции различных штаммов ВПГ заражение культуры СПЭВ проводилось адсорбционным методом с использованием различных доз вируса. Результаты опытов показали, что даже при высокой множественности заражения вирусы не оказывали выраженного ЦПД на клетки СПЭВ при наблюдении до 14 дней. В большинстве случаев зараженные культуры отличались от контроля лишь заметным уплотнением монослоя к 10—14-му дням. Лишь иногда, спустя 5—6 дней после заражения, в культурах наблюдалось некоторое разрежение монослоя и появление небольших очагов деструкции; наиболее выраженными эти изменения были в культуре зараженных штаммом ВГГ-3.

Судя по результатам титрования сливов на чувствительной культуре FL, все штаммы ВПГ I и II типов репродуцировались в клетках СПЭВ. При множественности заражения—0,3 ТЦД₅₀ на клетку все вирусы, за исключением HSV-2, обнаруживались в культуральной среде в невысоких титрах (1—2 lg) спустя 2 часа с момента заражения; в дальнейшем титры постепенно нарастали, достигая максимума на 4—5-й день (4—5 lg), после чего репродукция шла на убыль, хотя инфекционный вирус обнаруживался в культуральной среде еще до 7—8 дней с момента заражения.

Обращает на себя внимание поведение эталонного штамма—HSV-2, который независимо от множественности заражения репродуцировался в клетках СПЭВ в низких титрах; максимальное накопление его при заражающей дозе—0,3 ТЦД₅₀ на клетку отмечалось на 3—4-й дни (титр 2 lg); при более низкой множественности заражения—0,03 ТЦД₅₀ на клетку, когда репродукция остальных штаммов ВПГ была лишь несколько ниже, HSV-2 не выявлялся в жидкой фазе, но обнаруживался в клеточной фракции, где титр его обычно не превышал 1 lg.

2. Хроническая инфекция клеток СПЭВ, обусловленная различными серотипами вируса простого герпеса.

Заражение клеток СПЭВ 6 штаммами ВПГ проводили адсорбционным методом с применением различных доз вируса. На 7-й день с момента заражения клетки культур пересеивались (I пассаж). При этом культуры, инфицированные различными штаммами ВПГ, вели себя неодинаково. Так, клетки культуры «СПЭВ+ВГГ-3» после пассажа не выросли: отдельные прикрепившиеся к стеклу клетки вскоре погибли, причем в культуральной среде обнаруживался инфекционный вирус.

В культуре «СПЭВ+ВГФ-1» после посева выросли отдельные очаги клеток, которые продуцировали инфекционный вирус. Однако, несмотря на ежедневную смену среды для удаления продуцируемого вируса, к концу недели очаги полностью дегенерировали. Учитывая отрицательные опыты с ВГФ-1 при использовании множественности заражения 0,3 ТЦД₅₀ на клетку, мы попытались воспроизвести хроническую инфекцию СПЭВ с помощью меньшей дозы этого вируса—0,03 ТЦД₅₀

на клетку. При этом I пересев культуры был сделан не через неделю, как в первом опыте, а спустя 15 дней с момента заражения при отсутствии цитопатического эффекта и некотором уплотнении культуры. После первого посева монослой сформировался к 5-му дню, морфологически клетки культуры не отличались от контрольных. На сравнительно ранних пассажах (до 4—5-го) инфекционный вирус в культуре не обнаруживался, а с 10-го пассажа, когда темпы роста культуры несколько снизились и клетки стали зернистыми, в культуральной жидкости был обнаружен инфекционный вирус в невысоких титрах (10 ТЦД₅₀/мл). Данная культура прошла 12 пассажей в течение 90 дней.

Иначе вели себя клетки культуры «СПЭВ+HSV-1», где уже к 3-му дню с момента посева сформировался монослой. Инфекционный вирус обнаруживали в сливах на протяжении всей жизни культуры, которая прошла 6 пассажей в течение 60 дней. После 3-го пассажа в культуре отмечались очаги круглоклеточной дегенерации, что, по-видимому, обуславливалось частичным цитопатическим действием вируса. Однако очаги деструкции не мешали формированию монослоя, и по темпам роста культура лишь несколько отставала от контроля: монослой в опыте формировался на 5—7-й день, в контроле — на 2—3-й день.

Поведение культуры «СПЭВ+ВГФ-2» также имело свои особенности. После I посева появились небольшие островки клеток, за которыми велось тщательное наблюдение при регулярной смене среды с целью удаления инфекционного вируса. Однако большинство очагов постепенно дегенерировало, и через 2 недели в культуре сохранилась лишь одна колония жизнеспособных клеток, которая начала постепенно разрастаться. С целью стимуляции роста этих клеток был сделан пассаж колонии на месте, и через неделю во флаконе сформировался монослой. На 1, 2 и 3-ем пассажах инфекционный вирус обнаруживался в жидкой фазе, но после 4-го пассажа и последующих вирус не удавалось обнаружить ни в жидкой, ни в клеточной фазе. В связи с этим на 13-ом пассаже была предпринята попытка активации инфекционного вируса путем сокультивирования клеток культуры с чувствительными клетками FL. Клетки обеих культур смешивали в соотношении 1:1. Сливы и клеточную фракцию в различные сроки после сокультивирования титровали на клетках FL. Судя по результатам титрования, инфекционный вирус продуцировался клетками смешанных культур в очень небольшом количестве (2—5 ТЦД₅₀/мл), что свидетельствует о наличии полного генома ВГФ-2 в отдельных клетках культуры «СПЭВ+ВГФ-2» на 13-ом пассаже.

Так как одним из доказательств персистенции ВГФ-2 в культуре СПЭВ можно считать ее резистентность к повторному заражению гомологичным вирусом, изучаемая культура на 16-ом пассаже была суперинфицирована ВГФ-2 в дозе 0,3 ТЦД₅₀/мл, обеспечивающей выраженную репродукцию вируса в контроле. Судя по результатам титрования сливов на клетках FL, в суперинфицированной культуре репродукции вируса не наблюдалось, что свидетельствует о резистентности кле-

ток культуры к ВГФ-2. Попытки выявить в хронически инфицированной культуре «СПЭВ+ВГФ-2» вирусный антиген с помощью метода Кунса были неудачными, что, возможно, связано с индукцией вирусного антигена небольшим процентом клеток.

Клетки СПЭВ, зараженные вирусом HSV-2, после I-го и последующих пассажей по темпам роста и морфологии клеток существенно не отличались от контрольных. Инфекционный вирус не обнаруживался в культуральной среде, однако выявлялся в клеточной фракции (5—10 ТЦД₅₀/мл) на уровне первых четырех пассажей. Культура «СПЭВ+HSV-2» прошла 9 пассажей в течение 40 дней.

Характеристика хронически инфицированных культур представлена в таблице.

Т а б л и ц а

Характеристика хронически инфицированных вирусом простого герпеса культур СПЭВ

Зараженные культуры	Множественность заражения ТЦД ₅₀ /кл	Число пассажей заражен. культур	Продолжительность жизни в днях
СПЭВ+ВГФ-2	0,3	45	328
СПЭВ+HSV-2	0,3	9	40
СПЭВ+HSV-1	0,3	5	60
СПЭВ+ВГФ-1	0,03	12	90

Как видно из таблицы, хроническая инфекция воспроизведена с 4 из 5 штаммов ВПГ, при этом в 3 случаях была использована одинаковая заражающая доза и лишь с ВГФ-1, где с указанной дозой в первом опыте получены отрицательные результаты, была применена в 10 раз меньшая множественность заражения. Продолжительность жизни инфицированных культур колебалась от 40 до 328 дней. В культурах СПЭВ периодически на уровне разных пассажей обнаруживался инфекционный вирус.

Итак, в клетках культуры СПЭВ большинство штаммов I и II серотипов ВПГ репродуцировались без выраженного ЦПД, исключение составлял ВГГ-3—местный генитальный штамм, который вызывал в поздние сроки после заражения частичную деструкцию клеток. Титры вирусов I и II серотипов в клетках СПЭВ уступали титрам их в клетках FL, наиболее низкая репродуктивная способность отмечалась у эталонного штамма серотипа II—HSV-2. Полученные результаты свидетельствовали о целесообразности использования культуры клеток СПЭВ для воспроизведения хронической герпетической инфекции и изучения некоторых ее особенностей.

Согласно полученным результатам, с большинством штаммов ВПГ удалось воспроизвести хроническую инфекцию клеток СПЭВ, о развитии которой свидетельствовали: периодическое обнаружение инфекционного вируса в культуральной среде или в клеточной фракции, возможность активации вируса герпеса путем сокультивирования инфициро-

ванных клеток СПЭВ с чувствительными клетками FL, устойчивость зараженной культуры к повторному инфицированию аналогичным вирусом.

Наиболее трудной фазой становления хронически инфицированных культур был период после I пересева, особенности которого во многом зависели от штамма вируса. Культуры, зараженные сравнительно недавно выделенными местными штаммами серотипа I (ВГФ-1 и ВГФ-2) и серотипа II (ВГГ-3) при I пересеве, в силу, по-видимому, большей агрессивности вирусов для делящихся клеток или погибали (ВГФ-1, ВГГ-3), или с большим трудом выживали и росли до монослоя (ВГФ-2). В то же время культуры, зараженные американскими штаммами как серотипа I, так и II, долго культивируемые в лабораторных условиях, значительно легче перевивались и меньше отличались от контрольных культур. Воспроизведение хронической инфекции в культуре СПЭВ удавалось с обоими серотипами вируса.

Институт рентгенологии и онкологии
им В. А. Фанарджяна

Поступила 7/VI 1979 г.

Ն. ՈՒ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ, Վ. Ի. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Է. Ա. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ,
Զ. Ս. ՃՇՄԱՐԻՏՅԱՆ, Լ. Ա. ԲԱՄԱԼՅԱՆ

ՀԱՍԱՐԱԿ ՀԵՐՊԵՍԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈՋԻ ՍԱՂՄԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ԱՆԸՆԻՀԱՏ ՊԱՏՎԱՍՏՎՈՂ ԳԾԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՀԵՏ

Ուսումնասիրված են հասարակ հերպեսի վիրուսի երկու սերոտիպերի զարգացման առանձնահատկությունները խոզի սաղմի երիկամների անընդհատ պատվաստվող գծի բջիջների մեջ: Ցույց է տրված երկու սերոտիպերի ընդունակությունը զարգանալ այդ կուլտուրայի բջիջներում առանց ցիտոպատոգեն ազդեցության, արդ առումով նա օգտագործված է խրոնիկ հերպետիկ ինֆեկցիայի վերարտադրման և ուսումնասիրման համար:

Վերջինը հաջողվեց վերարտադրել վիրուսի երկու սերոտիպերի շտամների մեծամասնության միջոցով:

Կուլտուրայի բջիջներում խրոնիկական ինֆեկցիայի զարգացման մասին վկայում էին՝ ինֆեկցիոն վիրուսի պարբերական հայտնաբերումը հեղուկ և բջջային ֆրակցիաներում, հերպեսի վիրուսի ակտիվացման հնարավորությունը վարակված բջիջները զգայուն բջիջների հետ համատեղ կուլտիվացման միջոցով, վարակված կուլտուրայի ձեռք բերված կայունությունը դեպի կրկնակի վարակումը նույնանման վիրուսով:

N. U. NADJARIAN, V. I. GEVORKIAN, E. A. MOVSESSIAN,
CH. S. CHSHMARITIAN, L. A. KAMALIAN

INTERACTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS WITH CELL LINE OBTAINED FROM THE KIDNEY OF PIG EMBRYOS

The reproduction of two serotypes of herpes simplex virus in cell culture was studied. The capacity of both serotypes of the virus to reproduction in cells of the culture without cytopathic effect was revealed.

led and it was used for obtaining and study of chronic herpes infection. About the development of chronic infection in cell culture testified periodical revelation of infection virus in culture medium and cell fraction, the possibility of virus activation by cocultivation of infected cells with sensitive cells in vitro and the resistance of infected cell culture to superinfection by the same virus.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Советова Г. П., Спыну К. И., Амченкова А. И. Вопросы вирусологии, 1976, 4, стр. 456.
2. Coleman V., Jawetz E. Virology, 1961, 13, 375.
3. O'Neill F. Z., Golberg R. J., Rapp F. J. Gen. Virology, 1972, 14, 189.
4. Slavikova K., Blaškovič D., Slavic J., Leššo J. Cs. epidemiol., microbiol., immunol., 1976, 25 3, 144.
5. Szanto J., Leššo J., Lackovič V. Acta virol., 1976, 20, 40.
6. Wheeler C. E. J. Immunol., 1960, 84, 394.