

ПУТИ ВХОДА ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА *PICORNAVIRIDAE* В РЕЗИДЕНТНЫЕ МАКРОФАГИ

© Н. Г. Плехова,^{1,*} Л. М. Сомова,¹ С. В. Должиков,¹
Т. В. Фролова,² Л. С. Карань,³ В. И. Злобин²

¹ Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток,

² Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН и

³ Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, Москва;

* электронный адрес: pl_nat@hotmail.com

Для вирусов характерно несколько механизмов проникновения в клетки: клатрин- или динамин-опосредованным эндоцитозом, путем образования кавеол и локального лизиса мембраны клеток, а также макропиноцитозом. Принято, что вирусы без наличия суперкапсида, к которым относится семейство *Picornaviridae*, в основном входят в клетки путем локального лизиса их мембраны. Цель настоящего исследования — изучить механизмы проникновения в резидентные макрофаги вирусов указанного семейства — полиовируса, вирусов Echo11 и Коксаки В₁ и энтеровируса 71-го типа. Установлено, что в месте адгезии вируса Коксаки В₁ и энтеровируса 71-го типа на поверхности макрофагов выявляются участки инвагинации плазматической мембраны клеток при последующем образовании внутрицитоплазматических везикул — кавеол. Проникновение полиовируса в макрофаги происходило как путем образования кавеол, так и путем локального лизиса плазмалеммы клеток, а в более поздние сроки (через 45 мин) наблюдали макропиноцитоз вирусных частиц. В течение первых 15 мин вирус Echo11 проникал в цитоплазму макрофагов путем локального лизиса их плазмалеммы. В дальнейшем наблюдали формирование в цитоплазме зараженных макрофагов эндоцитарных вакуолей с включенными в них вирусными частицами. Выход вируса Echo11 из эндоцитарных вакуолей осуществлялся путем локального лизиса мембраны клеток.

Ключевые слова: макрофаги(моноциты), энтеровирусы, ультраструктура.

Для реализации программы репликации вирусам необходимо транспортировать генетическую информацию к определенным цитоплазматическим или ядерным структурам клетки. Первым этапом этого многоступенчатого процесса является присоединение вирусных частиц к наружной поверхности плазматической мембраны клеток, вторым — вход вирусных частиц в цитоплазму клеток. Ранее считалось, что вирусы проникают в клетку только путем эндоцитоза или виropексиса. В настоящее время выделяют 6 механизмов проникновения вирусов (March, Helenius, 2006): макропиноцитоз, три вида эндоцитоза с помощью образования кавеол (клатринзависимый, клатриннезависимый и холестеролзависимый) и подобный ему механизм, зависимый от динамина. Для вирусов с наличием суперкапсида общим принципом входа является механизм слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки, зависимый от белков слияния (клатрина и динамина). Для «неодетых» вирусов, без суперкапсида, к которым относятся вирусы семейства *Picornaviridae*, характерен механизм локального лизиса плазмалеммы либо образование кавеол.

Система мононуклеарных фагоцитов филогенетически относится к самой древней системе иммунитета. На поверхности плазматической мембраны макрофагов находятся многочисленные рецепторы, принимающие участие в процессах адгезии, эндо- и фагоцитоза, межклеточ-

ных взаимодействиях и др. (Helmy et al., 2006). Известно, что в процессе адгезии различных типов вирусов участвуют интегрины (гликопротеины, состоящие из различных комбинаций α - и β -цепей), которые также присутствуют на мембране макрофагов (Nauwynck et al., 1999; Vuorinen et al., 1999).

Семейство *Picornaviridae* включает в себя РНК-содержащие вирусы диаметром 22—30 нм. Нуклеокапсиды организованы по типу кубической симметрии, суперкапсид отсутствует. Вирусы этого семейства являются возбудителями острых инфекций: полиовирус поражает нейроны спинного мозга, вирусы Коксаки группы В инфицируют центральную нервную систему, энтеровирусы 71-го типа вызывают конъюнктивит, Echo-вирусы — кишечные инфекции (Поздеев, 2001). Из литературы известно, что первичное размножение энтеровирусов происходит в тканях респираторного и кишечного трактов. Этот процесс может следовать за первичным вирусным инфицированием крови, и есть данные о том, что энтеровирусы могут изолироваться из мононуклеарных клеток периферической крови больных *in vitro* (Prather et al., 1984; Dagan, Menegus, 1992; Freistadt, Eberle, 1996). При этом указывается на возможность размножения полиовируса в клетках крови человека, что говорит об определенной роли моноцитов в транспортировке вируса в инфицированном организме.

На основании вышеизложенного цель настоящего исследования — определить вероятность адгезии и механизм проникновения энтеровирусов в резидентные макрофаги.

Материал и методика

Первичная культура макрофагов. Клетки перитонеального экссудата собирали промыванием брюшной полости беспородных белых мышей 5 мл холодной среды RPMI, включающей в себя гепарин в концентрации 5 ед./мл. Полученную взвесь центрифугировали при 4 °С в течение 7 мин и отмывали от гепарина 3 раза. Концентрацию клеток доводили до $5 \cdot 10^6$ кл./мл в среде 199, содержащей 5 % сыворотки крови плодов коровы (НПО «Вектор», пос. Кольцово), инактивированный при 50 °С в течение 30 мин, не содержащей антибиотиков, и разливали по 2 мл в пробирки с покровными стеклами. Для адгезии макрофагов суспензию клеток оставляли в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Через 40 мин непривившиеся клетки отмывали тем же составом среды дважды и оставляли в термостате на 3 сут при том же составе воздуха, после чего использовали для экспериментов. Качество макрофагальной культуры оценивали методом прижизненного наблюдения клеток с помощью фазового контраста.

Серотипы энтеровирусов и условия эксперимента. Для заражения макрофагов использовали вакцинный штамм LSc2ab вируса полиомиелита типа 1; энтеровирус типа 71, штамм «Каримов», сибирский, увеатропный, и вирус Коксаки В типа 1, штамм Conn.5, протипный. Указанные штаммы вирусов любезно предоставлены д.м.н. Г. А. Королевой (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН). В экспериментах использовали супернатантную вирусосодержащую культуральную жидкость, включающую в себя не менее 10 инфекционных единиц на макрофаг для энтеровируса 71-го типа, Echo11 и Коксаки В₁ и не менее 5 для полиовируса (исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вирусов, используемых для заражения).

Время контакта первичной культуры макрофагов с вирусами составило 60 мин, после чего монослой для удаления внеклеточно расположенного антигена дважды промывали средой 199 и продолжали инкубацию в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 ч и 2, 3 или 4 сут. Для определения РНК и антигенов энтеровирусов монослой зараженных макрофагов и надосадочную жидкость через 1, 6, 24 и 48 ч инкубации замораживали.

Оценка динамики накопления вирусного антигена в клетках: непрямого метод флуоресцирующих антител (нМФА). Для выявления антигенов энтеровирусов в макрофагах применяли гомологичную иммуноасцитическую жидкость к энтеровирусам (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Москва) и диагностическую флуоресцирующую сыворотку против иммуноглобулинов G мыши (ICN, США) по стандартной методике (Кармышева, 1979). Препараты исследовали в люминесцентном микроскопе, используя необходимые возбуждающие (ФС, СС и ЭС) и запирающие (ЖС-18 и ЖС-19) фильтры под иммерсионным водным объективом. С помощью фазового контраста просматривали 100 клеток и по наличию

специфического свечения определяли долю антигенсодержащих.

Детекция антигенов и РНК энтеровирусов. Детекцию вирусной РНК осуществляли с помощью ПЦР, используя тест-систему «Амплисенс Энтеровирусы» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Измерение концентрации РНК энтеровирусов проводили с применением метода лимитирующих разведений также с вышеуказанной тест-системой.

Для количественной идентификации антигенов энтеровирусов в макрофагах использовали иммуноферментную тест-систему (НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск). Выявление комплекса антиген—антитело в образцах проводили с помощью иммуноферментного антивидового конъюгата, который проявляется при добавлении субстрат-индикаторного раствора в коричневом цвете различной интенсивности. Учет реакции осуществляли на спектрофотометре Multiscan Titertek Plus (Flow Lab., Финляндия) при длине волны 492 нм.

Определение инфекционного титра энтеровирусов проводили по цитопатогенному действию вируса Коксаки В₁ на перевиваемую культуру клеток эпителия почек эмбриона свиньи (СПЭВ), полиовируса, энтеровируса 71-го типа и Echo11 на культуру клеток RD.

Электронная микроскопия. Для выявления компонентов плазматической мембраны, монослой зараженных макрофагов помещали в комбинированный фиксатор на 1 ч при комнатной температуре (Ito, Karnovsky, 1968). Фиксатор, приготовленный на основе 0.2 М какодилатного буфера, pH 7.4, включал в себя 3 % параформальдегида и 0.02 % пикриновой кислоты. Параллельно дубликаты образцов фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.075 % рутениевого красного (ICN, США) (Neurolles et al., 1998) и 3 % глутаральдегида. Эти образцы отмывали трижды в 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.075 % рутениевого красного, и проводили постфиксацию в буфере того же состава, включающего в себя дополнительно 1 % OsO₄ (Serva, США), при комнатной температуре в течение 2 ч. Далее проводили дегидратацию как тех, так и других образцов в растворах этанола возрастающей концентрации и заключали в Эпон—Аралдит (Serva, США), используя плоскопараллельную заливку. Блоки освобождали от стекла в сжиженном азоте. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-V (Швеция) в плоскости, параллельной монослою клеток. Образцы контрастировали цитратом свинца по стандартной методике и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония).

Результаты

После 15-минутного контакта макрофагов с энтеровирусами выявлялись клетки с диффузным специфическим свечением цитоплазмы (рис. 1, б). Затем специфический антиген обнаруживался и в перинуклеарном пространстве цитоплазмы макрофагов (рис. 1, в, г). Количество антигенсодержащих клеток зависело от сроков инкубации. Так, через 1 ч совместной инкубации с энтеровирусами количество антигенсодержащих клеток составило от 26.7 ± 3.5 % (при инфицировании полиовирусом) до 68.3 ± 4.6 % (при заражении вирусом Коксаки В₁), а через 3 ч — от 48.3 ± 2.8 до 39.00 ± 2.07 % соответственно.

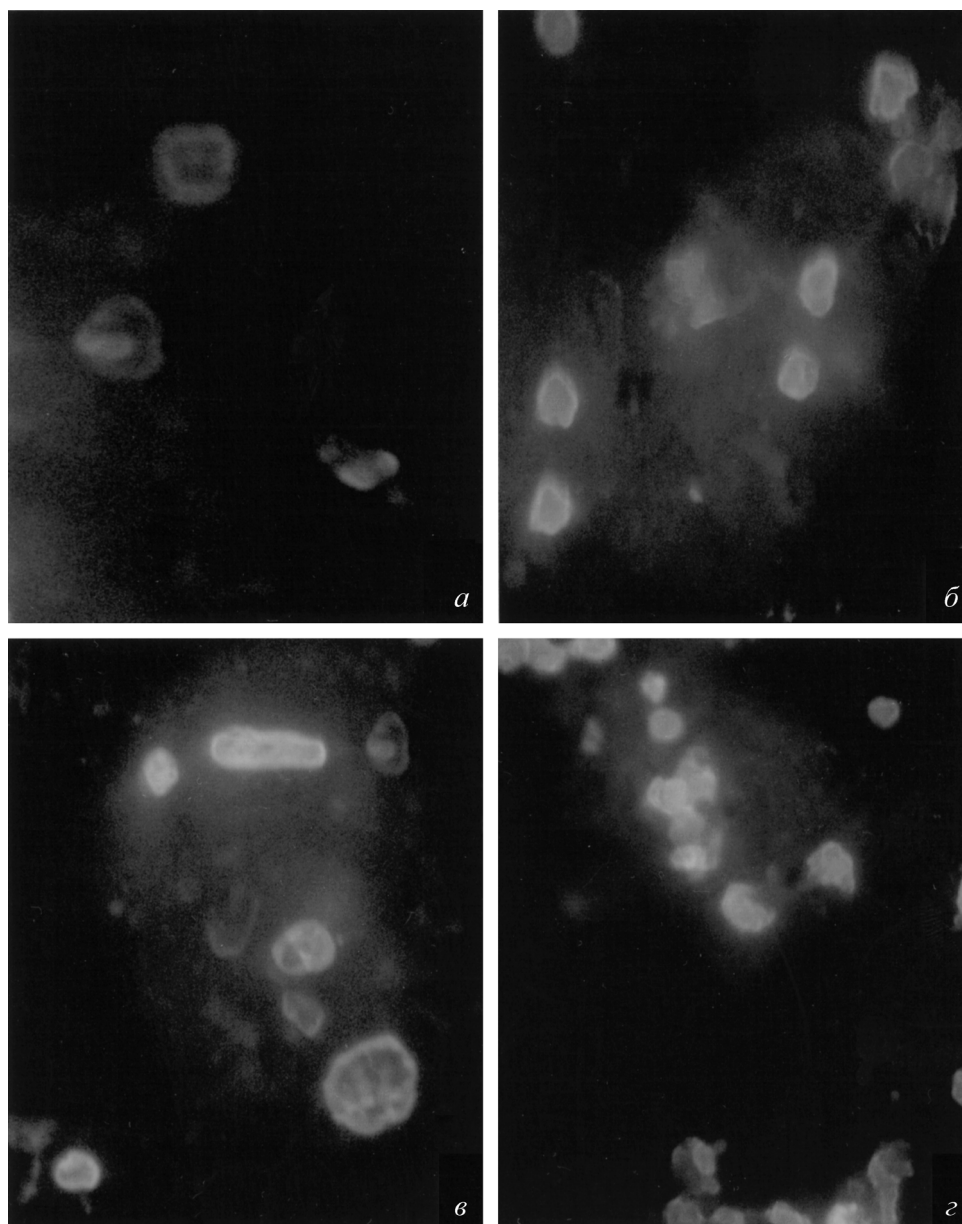


Рис. 1. Первичная культура макрофагов.

Интakтные клетки (а) и антигенсодержащие макрофаги через 15 (б), 30 (в) и 60 (г) мин контакта с вирусом Echo11. Непрямой метод флуоресцирующего антител. 1500 \times .

К 24 ч количество антигенсодержащих клеток уменьшалось до 12.0 ± 1.6 (полиовирус) и $26.4 \pm 1.7\%$ (вирус Коксаки В₁), а в конце срока наблюдения (3 сут) их не обнаруживали.

Адгезия энтеровирусов на макрофаги была подтверждена методом титрования надосадочных вирусосодержащих жидкостей на клеточных культурах. Через 15 мин контакта титр вируса снизился в среднем на 1.01 lg, через 30 мин — на 1.5 lg и через 60 мин — на 2.0 lg, что свидетельствовало об активной адсорбции вирусов семейства *Picornaviridae* на поверхности макрофагальных клеток.

Определение количества РНК с помощью ОТ-ПЦР и с использованием иммуноферментной тест-системы (специфических антигенных белков энтеровирусов) в макрофагальных клетках через определенные промежутки времени показало присутствие в них вирусных компонентов

(рис. 2). Эти результаты исследования указывали на способность энтеровирусов адгезировать и проникать в резидентные макрофаги.

При взаимодействии клетки и вируса возникает сложный комплекс морфологических и цитофизиологических изменений, которые специфичны только для данного типа взаимоотношений и не встречаются при других патологических состояниях клеток (Альштейн, 1982). Для выявления морфологических изменений структуры плазматической мембраны макрофагов в процессе проникновения в них энтеровирусов нами был использован комплексный фиксатор, предложенный Ито с коллегами (Ito, Karnovsky, 1968). Помимо этого, для определения зоны гликокаликса наружной мембраны макрофагов мы применили цитохимический метод, в основе которого лежит свойство анионных остатков полисахаридов гликокаликса избирательно присоединять рутениевый красный. В ре-

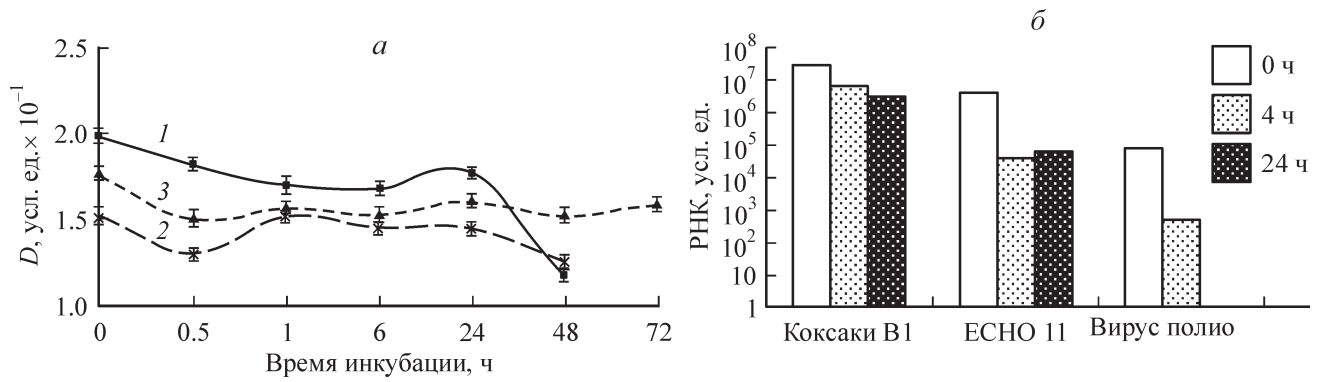


Рис. 2. Временная зависимость количества антигенных белков (а) и РНК (б) энтеровирусов в первичной культуре макрофагов при контактировании с вирусом Коксаки В₁ (1), вирусами полио (2) и Echo11 (3).

Количество антигенных белков определяли по оптической плотности раствора (D).

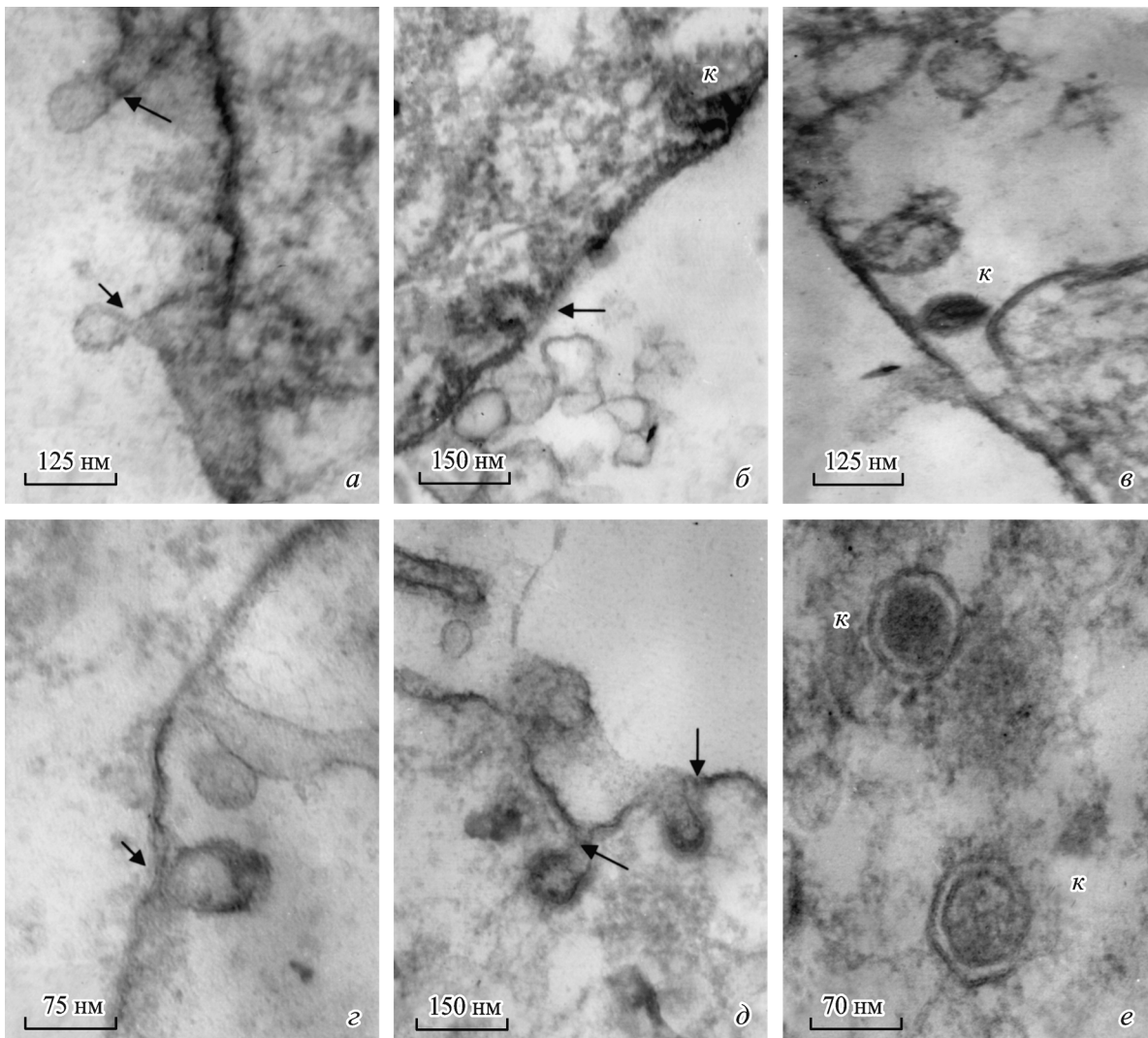


Рис. 3. Адгезия и вход (стрелки) путем образования кавеол (κ) энтеровируса 71-го типа (а—в) и вируса Коксаки В₁ (г—е) в макрофагальные клетки.

Обработка рутениевым красным.

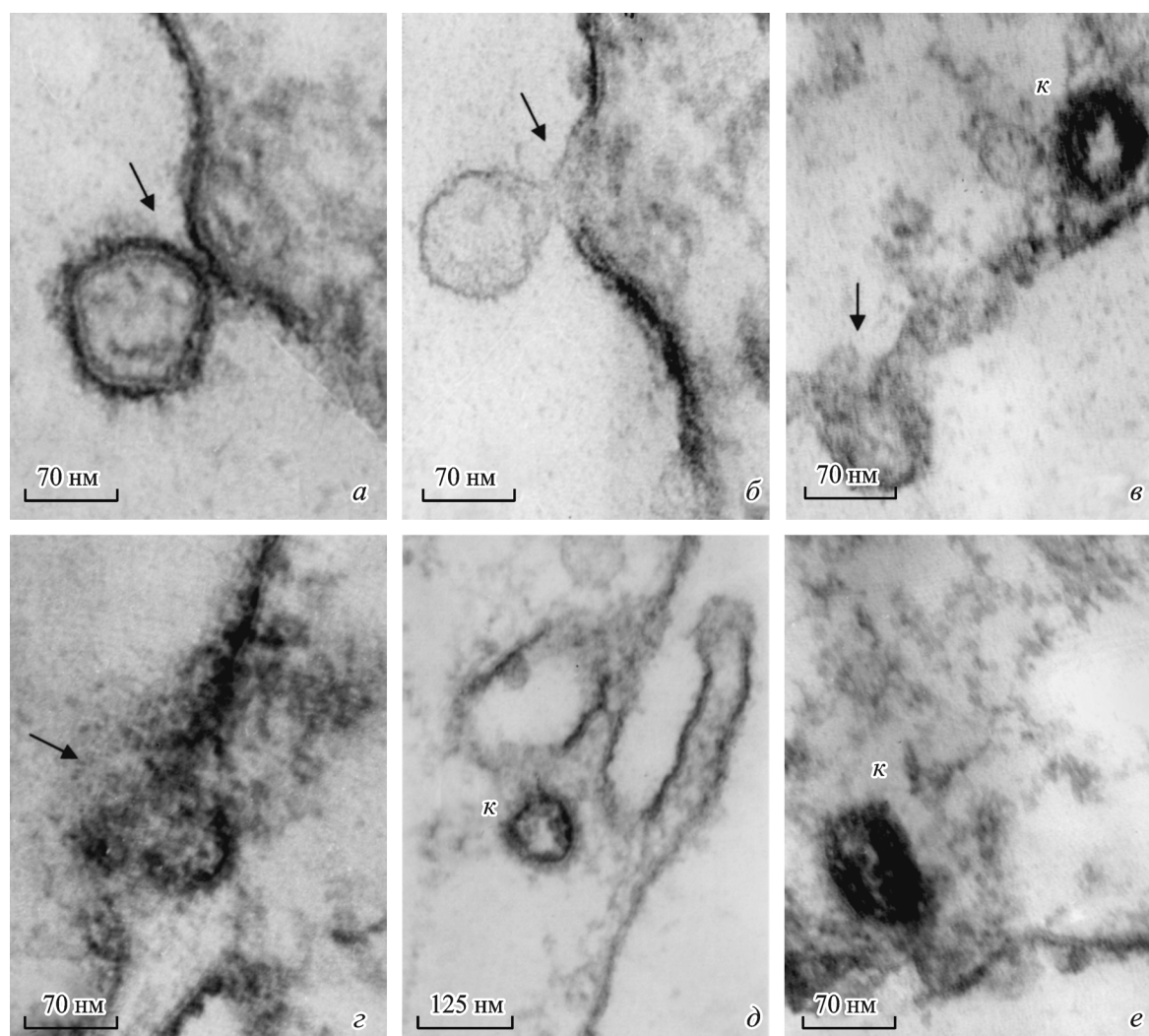


Рис. 4. Адгезия (*а, б*) и вход (*стрелки*) в макрофаги полиовируса в течение первых 15 мин после заражения путем локального лизиса плазматической мембраны макрофага (*в, з*) или путем образования кавеол (*к*) (*д, е*).

Обработка рутениевым красным.

зультате этой реакции образуются электронно-плотные соединения, отчетливо различаемые под электронным микроскопом (Maréchal et al., 2001). Таким образом, для выявления пути проникновения энтеровирусов в макрофаги мы применили комплексную обработку, которая позволила нам при взаимодействии энтеровирусов с макрофагами разграничить образование инвагинации плазмалеммы клетки или ее локальный лизис. Параллельно просматривали препараты, приготовленные с помощью классических электронно-микроскопических методов обработки.

При исследовании макрофагов, зараженных энтеровирусом 71-го типа и вирусом Коксаки В₁, определили, что вирусы способны адгезировать на поверхности макрофагов в течение 1-х мин контакта (рис. 3, *а, з*). На начальном этапе проникновения вирусов после присоединения нуклеокапсида к плазмалемме фагоцита наблюдали ее инвагинацию (рис. 3, *б, д*). Через 15 мин контакта макрофагов с энтеровирусом 71-го типа и вирусом Коксаки В₁ формировались внутрицитоплазматические вакуоли (рис. 3, *в, е*). Эти вакуоли мы классифицировали как кавеолы, так как их диаметр в среднем составлял 70—100 нм, что считается характерным для этих структур. Эндоцитарные вакуоли

имеют более крупные размеры (около 200 нм). Помимо этого, наблюдаемое нами в случае заражения макрофагов энтеровирусом 71-го типа или вирусом Коксаки В₁, плотное прилегание к поглощенному материалу участков плазмалеммы клетки-хозяина, образующих стенки кавеол, также является морфологическим признаком кавеол (Conner, Schmid, 2003). В кавеолах также отмечались разрыхление и утолщение нуклеокапсида энтеровирусов. Других способов проникновения этих вирусов в макрофаги мы не обнаружили. Таким образом, нами установлено, что энтеровирус 71-го типа вируса Коксаки В₁ входят в резидентные макрофаги только путем образования кавеол.

Адгезия полиовируса на поверхности макрофагов была выявлена нами в течение 1-х мин после заражения клеточной культуры (рис. 4, *а, б*). Далее отмечали проникновение полиовируса в цитоплазму макрофагов путем образования кавеол (рис. 4, *в, з*), а также локального лизиса плазмалеммы (рис. 4, *д, е*). С течением времени у макрофагов, зараженных этим вирусом, наблюдалось образование многочисленных псевдоподий (рис. 5, *а*), что указывало на активацию клеток. Часть этих псевдоподий преобразовывалась в макропиноцитарные вакуоли, в

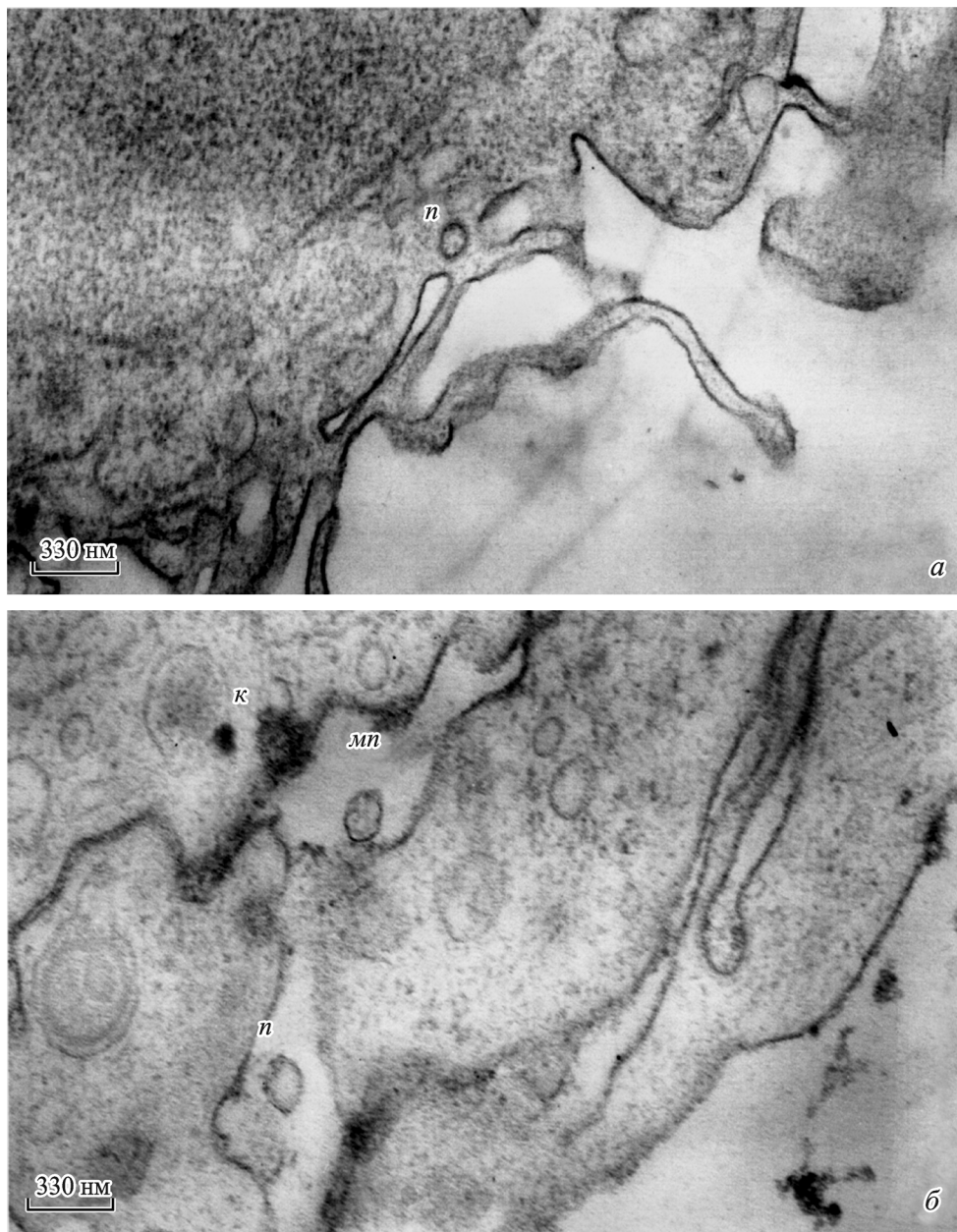


Рис. 5. Активация макрофага (а) и макропиноцитоз полиовируса (б) через 15 мин контакта.
Из вакуоли полиовирус (п) выходит в цитоплазму клетки путем образования кавеол (к); мп — макропиноцитоз.

которых определялись полиовирусы (рис. 5, б). Из макропиноцитарных вакуолей вирусные частицы выходят в цитоплазму макрофагов, образуя в основном кавеолы (рис. 5, б). Итак, нами выявлено, что вход полиовируса в макрофагальные клетки осуществляется тремя путями, а именно путем формирования кавеол, локального лизиса плазмалеммы и макропиноцитоза.

Энтеровирус Echo11 после адгезии в течение 1-х мин инфицирования проникает в цитоплазму макрофагов путем локального лизиса их плазмалеммы (рис. 6, б—г). При этом помимо указанного пути входа в макрофаги у энтеровируса Echo11 обнаруживается и другой механизм проникновения. Так, в течение первых 15 мин в цитоплазме зараженных макрофагов наблюдается формирование эндоцитарных вакуолей с включенными в них вирусными частицами (рис. 7, а, б). Выход энтеровируса Echo11 из данных вакуолей осуществляется также путем локально-

го лизиса из мембраны (рис. 7, в, г). Необходимо отметить наличие специфической активации макрофагов в ответ на заражение их данным энтеровирусом. Об этом свидетельствовало образование на поверхности фагоцитов клапановидных псевдоподий, содержащих электронно-плотные зернистые включения (рис. 8, а), которые с течением времени приобретали разветвленные очертания (рис. 8, б). Это косвенно указывало на специфическую хемотаксическую активность клеток.

Обсуждение

Первой стадией при вирусном инфицировании является адгезия вирусных частиц к специфическим рецепторам на клеточной поверхности, и для проникновения в клетки-мишени вирусы семейства *Picornaviridae* Echo11

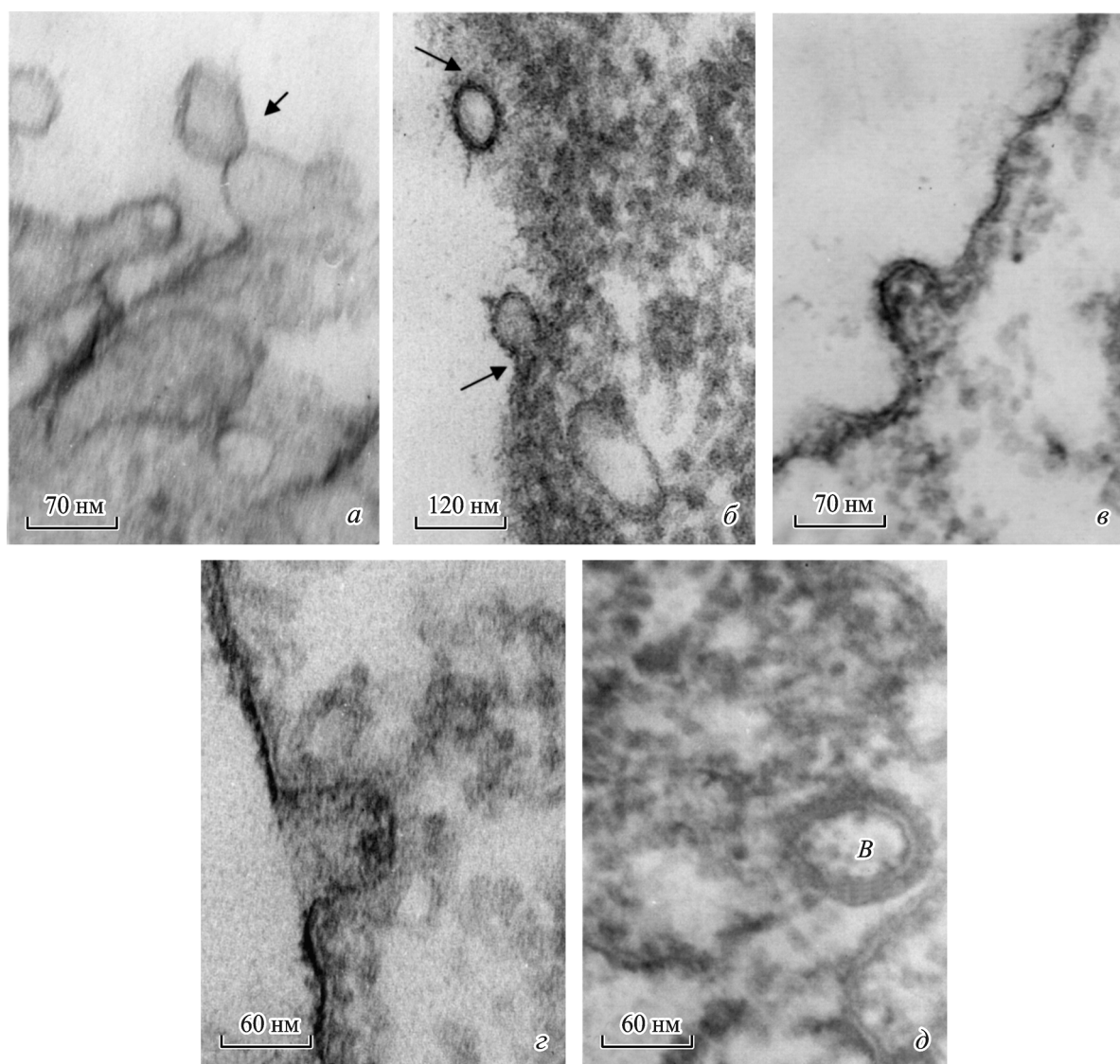


Рис. 6. Адгезия (а, б) и вход (стрелки) вируса Echo11 (В) путем локального лизиса плазматической мембраны макрофага (в—д) в течение первых 15 мин после заражения клеток.

Обработка рутениевым красным.

и Коксаки А₂₁ В₃ способны использовать α_v - или β_3 -интегрин (Bergelson et al., 1995, 1997; Xiao et al., 2001; Stuart et al., 2002). На поверхности моноцитов(макрофагов) также отмечаются интегрины (гликопротеины, состоящие из различных комбинаций α - и β -цепей) (Helmy et al., 2006), наличие которых и определяет способность вирусов семейства *Picornoviridae* инфицировать популяцию данных клеток. Было обнаружено, что, несмотря на сходство в структуре различных вирусов этого семейства, не все они способны активно присоединяться к плазмалемме моноцитов(макрофагов). Наиболее активно к поверхности большинства клеток моноцитарной линии присоединяется вирус Коксаки В₃ и наименее активно — полиовирус (Ebrle et al., 1995; Vuorinen et al., 1999).

В дальнейших исследованиях была выявлена зависимость адгезии к моноцитам(макрофагам) от нейротропных свойств полиовируса и энтеровируса 70-го типа: чем активнее были вирусы, тем к большему числу популяций клеток моноцитарной линии они присоединялись (Freistadt, Eberle, 1996; Haddad et al., 2004). Кроме этого, было

выявлено, что к поверхности зрелых макрофагов присоединяется большее количество полиовирусных частиц, чем к различным популяциям моноцитов (Wahid et al., 2005). Мы использовали смешанную популяцию перитонеальных клеток после предварительной инкубации в течение 3 сут, что, по данным литературы (Santin et al., 1999), соответствовало окончанию периода созревания моноцитов в резидентные макрофаги в результате их адгезии. Таким образом, мы получали примерно равноценную по функциональным свойствам популяцию резидентных макрофагов, которую впоследствии заражали вирусами семейства *Picornoviridae*. Методом нМФА нами было выявлено примерно одинаковое количество инфицированных клеток (количество антигенсодержащих клеток через 1 ч контакта в среднем составило 48.6 %), что указывало на равноценную адгезию всех использованных энтеровирусов к макрофагам. Эти результаты также были подтверждены и другими вирусологическими методами.

После адгезии на поверхности клетки начинается процесс проникновения вирусов в цитоплазму. В настоя-

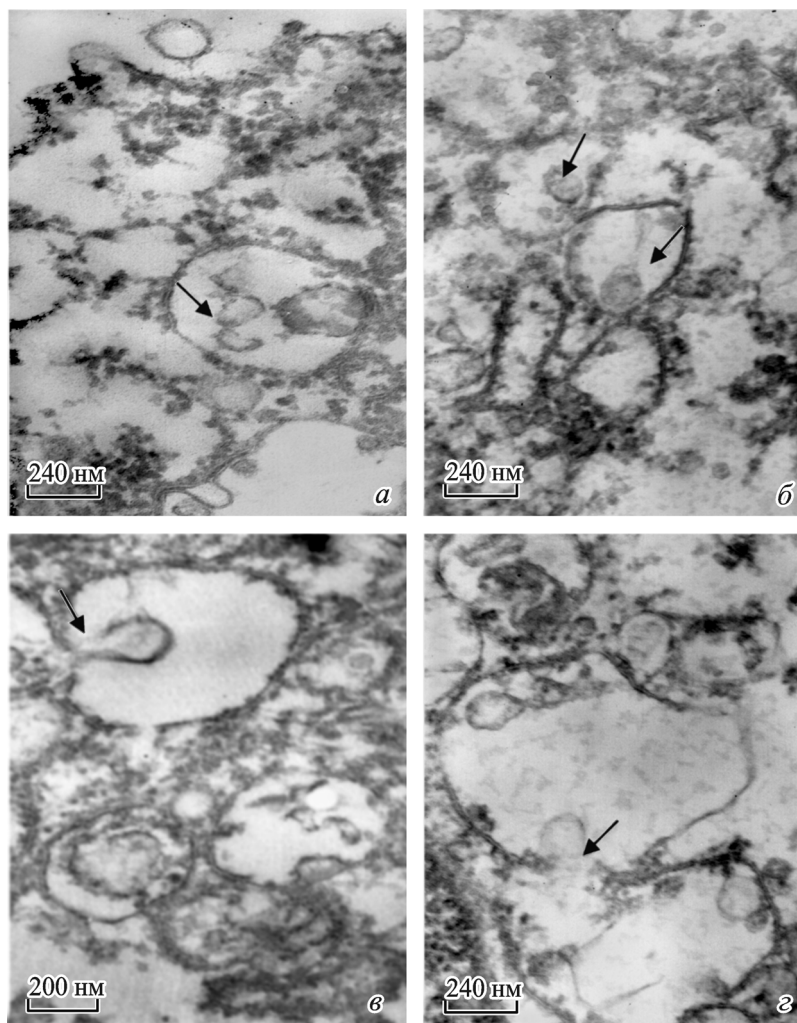


Рис. 7. Вход вируса Echo11 (стрелки) в эндоцитарных вакуолях (а, б) в макрофагальные клетки.

Выход вируса (стрелки) из эндоцитарных вакуолей в цитоплазму клетки осуществляется путем локального лизиса ее мембраны (в, г).

шее время исследователи разграничивают понятия проникновения (penetration) и входа (enter). Так, термин «проникновение» обозначает этап прохождения вирусной частицы через плазматическую мембрану клетки-хозяина, тогда как термин «вход» — более широкое понятие, включающее в себя как адгезию, так и проникновение вируса в цитоплазму (Poranen et al., 2002).

Принято, что вирусы без суперкапсида, к которым относятся энтеровирусы, преимущественно проникают в клетки путем клатринопосредованного эндоцитоза либо локального лизиса их мембраны (DeTulleo, Kirchhaussen, 1998). Так, вирусы Коксаки А₂₁ и В₁ (Shafren et al., 2000; Joki-Korpela et al., 2001) после присоединения к клеточной поверхности через рецепторы, характерные для адгезии аденовирусов и CD55, входят в клетки образуя кавеолы. При этом необходимо отметить, что в основном процессы входа и репродукции энтеровирусов исследовали на популяции клеток перевиваемых культур эпителиального происхождения. При инфицировании первичной культуры макрофагов энтеровирусами 71-го типа и вирусами Коксаки В₁ нами было обнаружено, что эти вирусы также входят в клетки путем формирования кавеол. Вход полиовируса в макрофаги осуществлялся тремя путями, а именно путем формирования кавеол, локального лизиса

плазмалеммы и макропиноцитозом (в случае продолжительной — 45 мин — инкубации).

В литературе указывается на проникновение полиовируса в клетки путем клатрин- либо динаминопосредованного эндоцитоза, при обязательном формировании везикул крупного размера (Dinter et al., 1985; Zeichhardt et al., 1998). Указывается также, что вход этих вирусов не зависит от динамина, так как для образования везикулы на поверхности клетки необходим фермент гуанинтрифосфатаза, активность которого в некоторых случаях не определяется, что позволяет предполагать вход полиовируса по иному пути (DeTulleo, Kirchhaussen, 1998). По нашему мнению, наблюдаемые нами способы проникновения полиовируса в макрофаги определяются специфичностью данной клетки как фагоцита, для которого характерно активное поглощение чужеродного материала. Подобные свойства макрофагов обнаруживаются после 45-минутной инкубации с полиовирусом, когда наблюдается макропиноцитоз вирусов, что связано с ответной реакцией клеток на их внедрение. Активация макрофагов в этот период была также подтверждена нами результатами биохимического исследования функционального состояния ферментов клеток, зараженных полиовирусом.

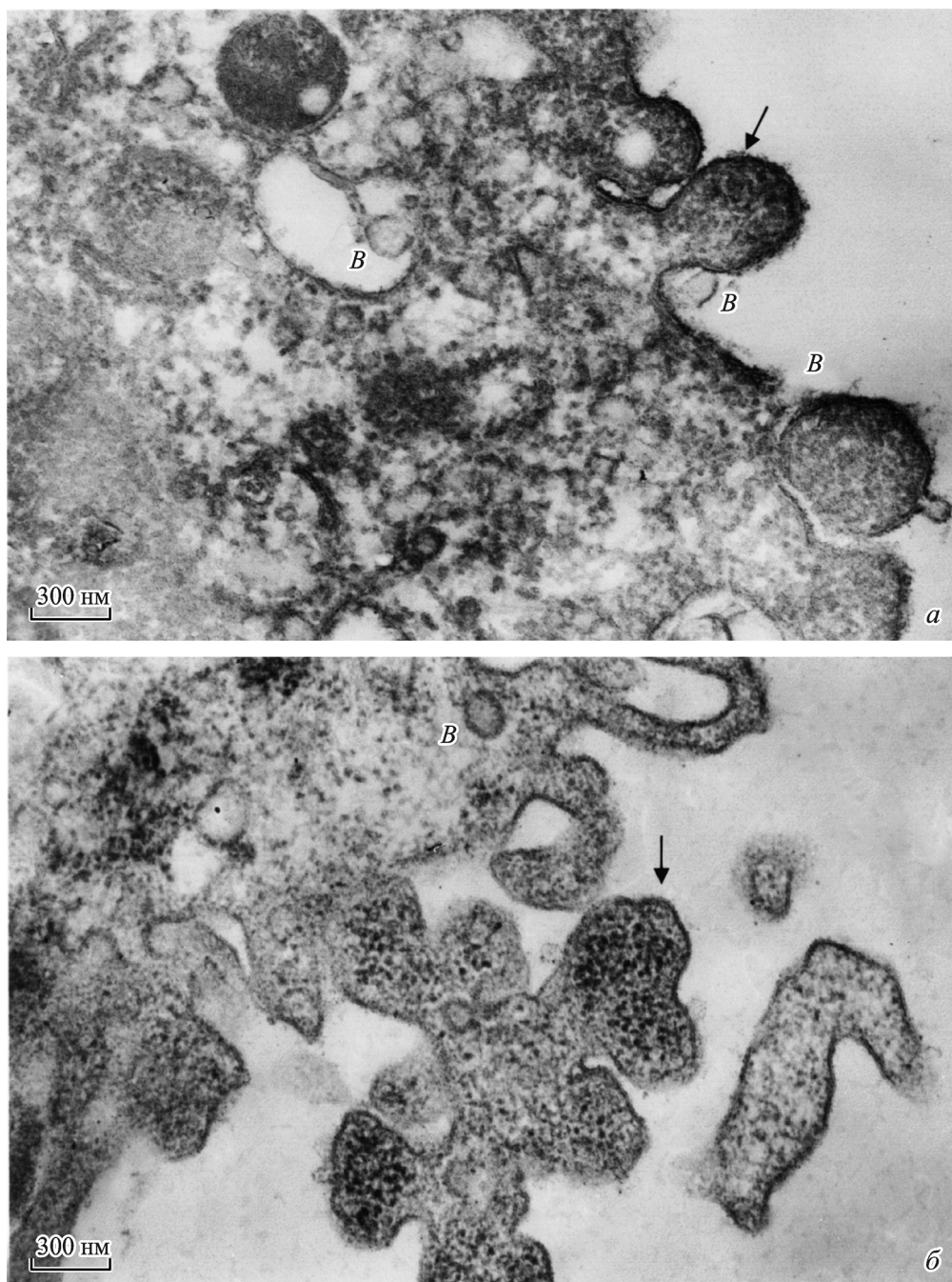


Рис. 8. Формирование класповидных псевдоподий (стрелки) на поверхности активированного макрофага через 15 (а) и 45 (б) мин заражения клеток вирусом Echo11 (В).

Обработка рутениевым красным.

Недавно различными исследователями сообщалось (Marjomaki et al., 2002; Pietianen et al., 2004), что эховирус 1, как и вирусы Коксаки, способен проникать в эпителиальные клетки перевиваемых культур путем образования кавеол. Нами обнаружено, что в течение первых 15 мин Echo11 проникает в цитоплазму макрофагов путем локального лизиса их плазмалеммы. В дальнейшем наблюдаются инвагинация и формирование зараженных макрофагов эндоцитарных вакуолей с включенными в них вирусными частицами. Выход вируса из эндоцитарных вакуолей осуществлялся путем локального лизиса мембраны клеток. Несмотря на наличие специ-

фической стимуляции макрофагов (появление на поверхности фагоцитов класповидных псевдоподий с электронно-плотными зернистыми включениями), мы не обнаружили макропиноцитоза.

Таким образом, нами установлено, что пути проникновения энтеровирусов в макрофаги разнообразны. По нашему мнению, это связано как с принадлежностью энтеровирусов к различным серовариантам, так и с клеточным типом, с которым они взаимодействуют, в данном случае — с относительно однородной популяцией резидентных макрофагов. На возможность проникновения вирусов различными путями в зависимости от типа клеток

также указывалось в литературе. Например, вирусы герпеса используют альтернативные пути входа (эндоцитарный или неэндоцитарный), зависящие от клеточного типа (кератиноциты или соответственно нейроны) (Nicola et al., 2005). Вирус Эпштейна—Барра входит в эпителиальные клетки путем слияния с их плазмалеммой, а в В-лимфоциты — эндоцитозом (Miller, Hutt-Fletcher, 1992), цитомегаловирус человека проникает в фибробласты путем локального лизиса их мембраны, а в эпителиоциты — с помощью эндоцитоза (Bodaghi et al., 1999).

Список литературы

- Альштейн А. Д. 1982. Вирусная инфекция клеток и клеточных популяций. В кн.: Общая и частная вирусология. М.: Медицина. 1 : 260—292.
- Кармышева В. Я. 1979. Применение метода флюоресцирующих антител в вирусологии. М.: Медицина. 177 с.
- Поздеев О. Л. 2001. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАРМЕД. 453—458.
- Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. C., Finberg R. W. 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 275 : 1320—1323.
- Bergelson J. M., Mohanty J. G., Crowell R. L., John N. F. St., Lublin D. M., Finberg R. W. 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* 69 : 1903—1906.
- Bodaghi B., Slobbe-van Drunen M. E., Topilko A., Perret E., Vossen R. C., van Dam-Mieras M. C., Zipeto D., Virelizier J. L., LeHoang P., Bruggeman C. A., Michelson S. 1999. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 : 2598—2607.
- Conner S. D., Schmid S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422 : 37—44.
- Dagan R., Menegus M. A. 1992. Replication of enteroviruses in human mononuclear cells. *Israel J. Med. Sci.* 28 : 369—372.
- DeTulleo L., Kirchhausen T. 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17 : 4585—4593.
- Dinter A., Berger E. G. 1998. Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell. Biol.* 109 : 571—590.
- Ebrele K. E., Nguyen V. T., Freistadt M. S. 1995. Low levels of poliovirus replication in primary human monocytes: possible interaction with lymphocytes. *Arch. Virol.* 140 : 2135—2150.
- Freistadt M. S., Eberle K. E. 1996. Correlation between Poliovirus type 1 Mahoney replication in blood cells and neurovirulence. *J. Virol.* 70 : 6486—6492.
- Haddad A., Nokhbeh M. R., Alexander D. A., Dawe S. J., Grise C., Gulzar N., Dimock K. 2004. Binding to Decay-Accelerating factor is not required for infection of human leukocyte cell lines by enterovirus 70. *J. Virol.* 78 : 2674—2681.
- Helmy K. Y., Katschke K. J., jr., Gorgani N. N., Kljavin N. M., Elliott J. M., Diehl L., Scales S. J., Ghilardi N., van Campagne M. L. 2006. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 124 : 915—927.
- Ito S., Karnovsky M. J. 1968. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompounds. *J. Cell Biol.* 39 : 168A.
- Joki-Korpela P., Marjomäki V., Krogerus C., Heino J., Hyypiä T. 2001. Entry of Human Parechovirus 1. *J. Virol.* 75 : 1958—1967.
- Maréchal V., Prevost M.-C., Petit C., Perret E., Heard J.-M., Schwartz O. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* 75 : 11166—11177.
- Marjomäki V., Pietiäinen V., Matilainen H., Upla P., Ivaska J., Nissinen L., Reunanen H., Huttunen P., Hyypiä T., Heino J. 2002. Internalization of Echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* 76 : 1856—1865.
- Marsh M., Helenius A. 2006. Virus entry: open sesame. *Cell*. 124 : 729—740.
- Miller N., Hutt-Fletcher L. M. 1992. Epstein—Barr virus enters B cell and epithelial cells by different routes. *J. Virol.* 66 : 3409—3414.
- Nauwynck H. J., Duan X., Favoreel H. W., Van Oostveldt P., Pensaert M. B. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80 : 297—305.
- Neyrolles O., Brenner C., Prevost M.-C., Fontaine T., Montagnier L., Blanchard A. 1998. Identification of two glycosylated components of *Mycoplasma penetrans*: a surface-exposed capsular polysaccharide and a glycolipid fraction. *Microbiology*. 144 : 1247—1255.
- Nicola A. V., Hou J., Major E. O., Straus S. E. 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J. Virol.* 79 : 7609—7616.
- Pietiäinen V., Marjomäki V., Upla P., Pelkmans L., Helenius A., Hyypiä T. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II and signaling events. *Mol. Biol. Cell*. 15 : 4911—4925.
- Poranen M. M., Daugelavicius R., Bamford D. H. 2002. Common principles in viral entry. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 : 521—538.
- Prather S. L., Dagan R., Jenista J. A., Menegus N. A. 1984. The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. *J. Med. Virol.* 14 : 221—227.
- Santin A. D., Hermonat P. L., Ravaggi A., Chiriva-Internati M., Cannon M. J., Hiserodt J. S., Pecorelli S., Parham G. P. 1999. Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs. macrophages from blood monocytes *in vitro*. *Immunobiology*. 200 : 187—204.
- Shafren D. R., Dorahy D. J., Thorne R. F., Barry R. D. 2000. Cytoplasmic interactions between decay-accelerating factor and intercellular adhesion molecule-1 are not required for coxsackievirus A21 cell infection. *J. Gen. Virol.* 81 : 889—894.
- Stuart A. D., Eustace H. E., McKee T. A., Brown T. D. K. A. 2002. Novel cell entry pathway for a DAF-using human Enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* 76 : 9307—9322.
- Vuorinen T., Vainionpää R., Heino J., Hyypiä T. 1999. Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. *J. Gen. Virol.* 80 : 921—927.
- Wahid R., Cannon M. J., Chow M. 2005. Dendritic cells and macrophages are productively infected by poliovirus. *J. Virol.* 79 : 401—409.
- Xiao C., Bator C. M., Bowman V. D., Rieder E., He Y., Hébert B., Bella J., Baker T. S., Wimmer E., Kuhn R. J., Rossmann M. G. 2001. Interaction of Coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1. *J. Virol.* 75 : 2444—2451.
- Zeichhardt H., Wetz K., Willingmann P., Habermehl K. O. 1985. Entry of poliovirus type 1 and mouse Elberfeld (ME) virus into HEp-2 cells: receptor-mediated endocytosis and endosomal or lysosomal uncoating. *J. Gen. Virol.* 66 : 483—492.

THE ENTER OF VIRUSES FAMILY *PICORNAVIRIDAE* IN RESIDENTS MACROPHAGES

N. G. Plekhova,^{1,*} L. M. Somova,¹ S. V. Dolzhikov,¹ T. V. Frolova,² L. S. Karan,³ V. I. Zlobin²

¹ Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of RAMS, Vladivostok,

² M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides RAMS and

³ Central Research Institute of Epidemiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow;

* e-mail: pl_nat@hotmail.com

Viruses enter in cells through clathrin- and dinamin-mediated uptake route-endocytosis, caveolae-mediated local destruction of cell plasma membranes, and macropinocytosis. The non-enveloped viruses to which *Picornaviridae* family is attributed are important human and animal pathogens. The aim of this study was to examine the mechanisms of penetration of viruses of this family (polio-, echo 11-, entero 71- and coxsackie B₁-viruses) into resident macrophages.

After attachment to the plasma membrane of macrophages the enterovirus 71 and coxsackievirus B₁ penetrated into macrophages by invagination of the plasma membrane and formation of intracytoplasmic vesicles — caveoles. The poliovirus entered macrophages both by caveols formation and local destruction of plasma membranes of the host cells. Macropinocytosis of polioviruses was observed after 45 min contact. The echovirus 11 entered in host macrophages by local destruction of their plasma membranes during first 15 min. Then the formation of endocytosed vesicles with included viruses was observed. The echovirus 11 went out of endocytosed vesicles by local destruction of membrane vesicles.

Key words: ultrastructure, monocytes/macrophages, enteroviruses.