

## СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАКРОФАГОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© Н. Г. Плехова,<sup>1,3,\*</sup> Е. В. Пустовалов,<sup>2</sup> Л. М. Сомова,<sup>3</sup>  
Г. Н. Леонова,<sup>3</sup> Е. И. Дробот,<sup>3</sup> И. Н. Ляпун<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский медицинский университет Министерства здравоохранения РФ,  
Центральная научная лаборатория, Владивосток, 690002,

<sup>2</sup> Дальневосточный государственный федеральный университет,  
Школа биомедицины, Владивосток, 690950, и

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова,  
Владивосток, 690087;

\* электронный адрес: pl\_nat@hotmail.com

Макрофаги, относящиеся к клеткам врожденного иммунитета, играют ключевую роль в патогенезе вирусных инфекций. Приведены результаты ультраструктурного исследования макрофагов, зараженных вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) семейства *Flavivirus*, возбудителя опасных для человека инфекций, поражающих нервную систему. С привлечением вирусологических методов установлено, что ВКЭ поглощается макрофагами и размножается в них. Ультраструктурные исследования показали, что вирус проникает в цитоплазму путем локального лизиса плазмалеммы и что новосинтезированные вирусные частицы покидают клетку тем же путем. Одновременно наблюдается уплотнение околоядерного пространства цитоплазмы, где в большом количестве обнаруживали рибосомы, микрофиламенты, рибонуклеопротеидные нити и вирусоспецифические структуры — нуклеокапсиды, трубчатые образования, виропласты. На поверхности виропластов визуализировали новосинтезированные вирусные частицы. Таким образом, приведены доказательства того, что макрофаги могут играть определенную роль в распространении ВКЭ, являясь для них мишенью. Как активные антигенпрезентирующие клетки подобные макрофаги могут модулировать защитный ответ организма и оказывать влияние на патогенез клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, макрофаги, ультраструктура, морфогенез, флавивирусы.

Принятые сокращения: ВКЭ — вирус клещевого энцефалита, нМФА — непрямой метод флуоресцирующих антител.

Клетки моноцитарного происхождения в силу доступности методов их выделения, фракционирования и культивирования служат хорошей моделью для изучения ряда общих цитофизиологических закономерностей. При всем разнообразии, обусловленном степенью зрелости и различной тканевой специализацией, клетки моноцитарного пула объединяют единство происхождения, сходство структур и метаболических процессов. На мембране моноцитов (макрофагов) экспрессированы рецепторы, специфичные для различных классов иммуноглобулинов — FcR, для фракций активированного комплемента, хемокинов, гликопротеины, маркирующие степень их дифференцировки (CD14, CD16), и обширный спектр патогенраспознающих рецепторов. Последние включают в себя Toll-подобные рецепторы (TLRs), рецепторы для лектинов С-типа (Cls), семейство цитоплазматических белков, индуцируемых геном ретиноевой кислоты, (RIG)-I-подобные рецепторы (RLRs) и нуклеотидсвязывающие олигомеризированные доменные рецепторы, NOD-подобные рецепторы (NLRs) (Takeuchi, Akira, 2010;

Schmidt et al., 2013; Baral et al., 2014). На поверхности стимулированных резидентных фагоцитов — макрофагов, на фоне специфических для моноцитарного пула рецепторов CD11b и F4/80 отмечаются снижение экспрессии рецептора для хемокинов Lу6С и активация рецептора гистосовместимости МНС-II, нехарактерного для поверхности нестимулированных клеток (Geissmann et al., 2010; Yang et al., 2014). Сопряженная с экспрессией указанных рецепторов функциональная состоятельность резидентных макрофагов места воспаления проявляется в специфичной адаптации к окружающим тканям. Такие клетки наряду с другими факторами обеспечивают элиминацию инфекционного агента путем продукции и выделения токсичных медиаторов, таких как оксид азота (NO) и активные формы кислорода (ROS). Такие активированные макрофаги способны различать инфицированные клетки, элиминировать их, что ограничивает распространение возбудителя из первичного очага инфекции (Martinez et al., 2009; Hume, 2012, 2015). С другой стороны, степень выраженности рецепторов адгезии и хемоки-

нов может оказывать влияние на восприимчивость фагоцитов к вирусному заражению (Bardina et al., 2015; Kumar et al., 2015; McCausland et al., 2015). Таким образом, макрофаги способны принимать непосредственное участие в обезвреживании возбудителя не только путем фагоцитоза зараженных вирусом клеток-мишеней (Chaturvedi et al., 2006; Jain et al., 2014), но и непосредственно поглощая сами вирусные частицы (Yokota et al., 2010; Ye et al., 2013), причем механизмы активации макрофагов при различных вирусных заболеваниях неидентичны. Как профессиональные фагоциты эти клетки способны инактивировать деятельность вируса (García-Nicolas et al., 2013; Uehara et al., 2015), но при резистентности к ферментному воздействию вирусы способны активно и нередко длительно репродуцироваться в клетках-хозяевах. С этих позиций особое значение имеет изучение состояния макрофагов в развитии ответной реакции в первые часы и сутки после заражения организма. Известно, что дефектное иммунорегуляторное проявление функциональной активности этих клеток как следствие или причина патологического процесса со временем неизбежно формирует системное поражение организма (Wei et al., 2013).

Флавивирусы, к числу которых относятся вирусы клещевого энцефалита (ВКЭ), японского энцефалита, Западного Нила, энцефалита Сент-Луис и др., являются нейротропными патогенами человека, как правило, вызывающими тяжелые и часто фатальные исходы нейроинфекции. ВКЭ имеет сферическую форму с нуклеокапсидом икосаэдрального типа симметрии с положительной РНК, покрытой снаружи суперкапсидной липопротеиновой оболочкой, состоящей из фосфолипидов и вирусоспецифических гликопротеинов, составляющих шипы около 10 нм длиной (эктодомены белка Е). При их участии происходит связывание наружной поверхности вируса с рецепторами плазмалеммы клетки-хозяина. Небольшой размер (диаметр 37—50 нм) позволяет ВКЭ проникать, минуя гематоэнцефалический барьер, в нервные ткани организма, инициировать воспаление с инфильтрацией ткани мозга клетками микроглии (макрофаги, мигрировавшие из кровотока) и дегенерацию нейронов (Maximova et al., 2008). Заражение человека происходит при укусе инфицированного клеща, при котором вирус проникает в дерму кожи. Причем содержимое слюнных желез клещей обладает локальным иммунодепрессивным эффектом, что способствует выживанию вируса во внутриэпидермальных макрофагах — клетках Лангерганса — и дендритных клетках дермы (Frischknecht, 2007). Вирус проникает в эти клетки, используя специфические внутриклеточные молекулы адгезии-3 (ICAM-3). Предполагается, что такие ВКЭ-инфицированные клетки могут мигрировать в лимфатические узлы, что может способствовать распространению вируса. Помимо этого, в месте укуса формируется воспаление, которое индуцирует приток нейтрофилов и моноцитов крови. Так, в первые 3 сут после заражения инфильтраты состоят преимущественно из этих клеток, и на 2—3-й нед болезни преобладающими становятся лимфоциты. Причем в ранний период виремии основная концентрация флавивирусов в крови сопряжена с наличием антигена в лейкоцитарных клетках (Леонова и др., 1991; Плехова, Сомова, 2010; Moniuszko et al., 2012; Krylova et al., 2015). Необходимо также отметить данные о подавлении функциональной активности моноцитов крови у больных клещевым энцефалитом при длительной и стабильной виремии (Пирогова и др., 2003) и об активном участии клеток микроглии в формирова-

нии очага воспаления, инициированного репродукцией ВКЭ в астроцитах и нейронах (Maximova и др., 2008).

Для выявления механизма взаимодействия клеток моноцитарно-макрофагальной системы с флавивирусами определенное значение имеют исследования на модели *in vitro*. Показано, что многие флавивирусы способны размножаться в этих клетках, причем к одному из уникальных свойств вирусов относится способность заражать популяции моноцитов (макрофагов) вне зависимости от стадии их дифференцировки (Chen, Wang, 2002; Wei et al., 2013). При проникновении в клетки микроглии вирусы Западного Нила и японского энцефалита активируют Toll-подобные и внутрицитозольные NOD-подобные патогенраспознающие рецепторы (Yokota et al., 2010; Carty et al., 2014; Jiang et al., 2014), но при этом имеют определенную стратегию ускользания от защитного ответа клеток (Ye et al., 2013). Все вышесказанное позволяет сделать вывод о несомненном участии клеток моноцитарно-макрофагальной системы в патогенезе флавивирусных инфекций. Тем не менее роль моноцитов (макрофагов) в защите организма при указанных инфекциях различными исследователями оценивается неоднозначно. С одной стороны, эти клетки рассматриваются в качестве фагоцитов, способных стимулировать в ответ на появление зараженных ВКЭ клеток или их фрагментов (Richard et al., 2015). С другой стороны, уделяется особое внимание способности ВКЭ к избирательной адсорбции на поверхности макрофага, что определяет его как клетку-мишень для репродукции (Ahantari et al., 2009).

В связи с вышесказанным цель настоящего исследования заключалась в изучении внутриклеточных изменений макрофагов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита.

## Материал и методика

Первичную культуру макрофагов получали из перитонеальной полости беспородных половозрелых белых мышей-самцов массой 18—25 г. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996). Концентрацию клеток доводили до  $4 \times 10^6$  кл./мл в среде RPMI (Sigma-Aldrich, США) с 5%-ной эмбриональной бычьей сывороткой (ICN, США) и разносили во флаконы с покровными стеклами по 1 мл. После 40 мин инкубации в термостате при 37 °С в смешанной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> неадгезированные клетки дважды отмывали средой RPMI и монослой адгезированных клеток заражали ВКЭ.

В работу был взят вирулентный штамм Dal'negorsk (Dal') вируса клещевого энцефалита I субтипа, выделенный из мозга умершего больного. В экспериментах использовали супернатантную культуральную жидкость клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ), зараженных вирусом, содержащую  $7 \log$  TCID<sub>50</sub>/мл. Пробы макрофагов заражали по 0.2 мл вирусосодержащей культуральной жидкостью, что составляло  $0.5 \log$  TCID<sub>50</sub>/макрофаг. После контакта в течение 60 мин монослой клеток дважды отмывали средой от неадгезированных вирусных частиц и продолжали инкубировать в термостате при 37 °С в течение 2—7, 9, 24, 48, 72 и 96 ч в среде RPMI, содержащей 5 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мкМ глутамин и 0.2 мкМ гентамицина (ICN, США). Накопление возбу-

дителя оценивали по определению антигена в макрофагах непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА) и вируса в культуральной жидкости путем титрования супернатантов проб на культуре клеток СПЭВ. Контроль культуры макрофагов осуществляли с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для цитологического исследования монослой зараженных ВКЭ клеток фиксировали в парах формалина и окрашивали азур-эозином по Нохт-Максимуму в течение 15 мин.

Для определения вирусного антигена с помощью нМФА использовали гомологичную иммуоасцитическую жидкость к штамму Dal' ВКЭ и иммуноглобулины флуоресцирующие видовые против иммуноглобулинов G мыши (ICN, США). Препараты исследовали с помощью лазерной конфокальной микроскопии в системе LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), при возбуждающем излучении с длиной волны 488 нм для FITC, определяли долю антиген-положительных клеток и интенсивность свечения. Подсчет инфекционного титра ВКЭ проводили по его цитопатогенному действию на клетки перевиваемой культуры СПЭВ.

Для изучения ультраструктуры макрофагов использовали комплексный фиксатор по Ито, который готовили на основе 0.2 М какодилатного буфера (pH 7.4) с добавлением 3 % параформальдегида и 0.02 % пикриновой кислоты. Для визуализации зоны гликокаликса мембраны макрофагов использовали цитохимический метод окрашивания рутениевым красным. Для дофиксации использовали 1%-ный раствор OsO<sub>4</sub> (Serva), дегидратацию проводили в этаноле с возрастающей концентрацией и образцы заключали в Эпон-Аралдит (Serva) с использованием метода плоскопараллельной заливки. Образцы контрастировали цитратом свинца по стандартной методике и исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония).

## Результаты

С помощью нМФА установлено, что через 1 ч контакта ВКЭ с макрофагами выявлялось специфическое свечение цитоплазмы, преимущественно диффузного характера, и в 20 ± 0.9 % антиген-позитивных клеток определялось локализованное свечение в виде глыбок (рис. 1, а). К 4 ч инкубации количество таких клеток возрастало до 35 ± 1.4 % (рис. 1, б), через 5 ч оно составило 87 ± ± 5.3 % и оставалось в этих пределах до 24 ч наблюдения.

Репродукция ВКЭ в макрофагах была подтверждена методом титрования надосадочной жидкости на культуре клеток СПЭВ. После инкубации зараженных макрофагов в течение 1 сут ВКЭ был обнаружен в надосадочной жидкости (1 log TCID<sub>50</sub>/мл), на 2-е сут отмечали повышение титра вируса до 2 log TCID<sub>50</sub>/мл. Эти данные указывают на адсорбцию и последующую репродукцию ВКЭ в первичной культуре макрофагов с его выходом во внеклеточное пространство.

При микроскопии окрашенных препаратов через 60 мин после контакта с ВКЭ преимущественно наблюдали активированные макрофаги с крупным азурофильным ядром, занимающим около 1/3 площади всей клетки, с многочисленными вакуолями в цитоплазме (рис. 1, з). В дальнейшем количество клеток с признаками деградации увеличивалось, и к концу наблюдения (4 сут) отмечалось их разрушение в результате цитопатогенного действия вируса. Наряду с подобными макрофагами выявляли

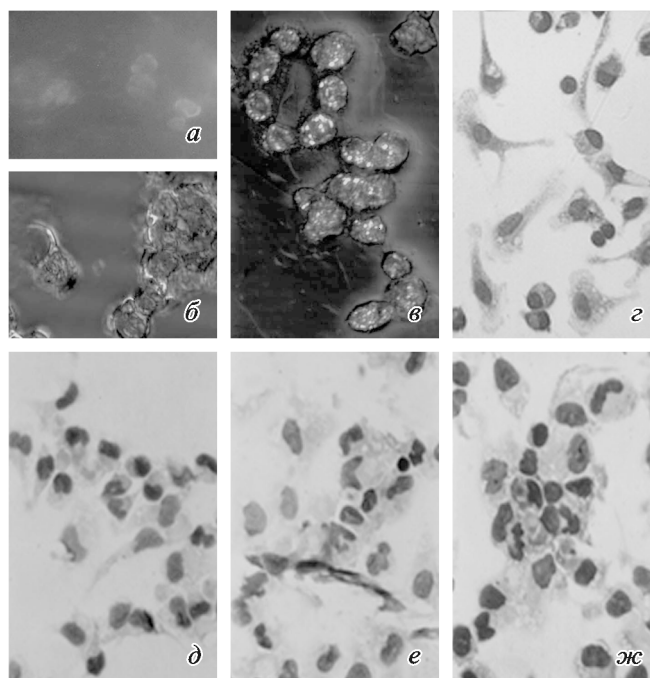


Рис. 1. Первичная культура макрофагов: морфологические особенности интактных (а, з) и зараженных ВКЭ (б, в, д—ж) клеток.

а—в — выявление вирусного антигена с помощью нМФА через 1 (б) и 5 (в) ч инкубации с ВКЭ; а — контрольные клетки, лазерная сканирующая микроскопия. з—ж — окраска по Нохт-Максимуму: з — интактные клетки; д — макрофаги через 24 ч после заражения ВКЭ, видны вакуолизация цитоплазмы и изменения ядер; е — клетки с признаками хемотаксиса, группа клеток, находящихся в тесном контакте (18 ч после заражения); ж — апоптотические изменения ядер макрофагов через 24 ч после заражения. Время инкубации с ВКЭ: 1 (б), 5 (в), 18 (е), 24 (д, ж) ч. Об. 100×.

около 5.00 ± 0.38 % клеток с признаками хемотаксической активности, веретенообразной формы с крупными псевдоподиями на противоположных полюсах клеток (рис. 1, д). Количество таких макрофагов значительно возрастало (до 25.0 ± 2.1 %) после 7 ч контакта с вирусом. Через 18—24 ч выявляли группы тесно контактирующих между собой клеток, состоящие из 4 клеток и более

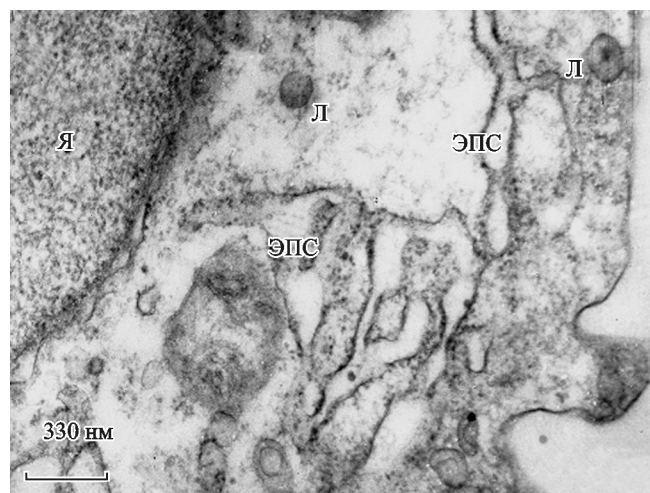


Рис. 2. Перитонеальный макрофаг (интактная культура).

Л — лизосомы, ЭПС — эндоплазматическая сеть, Я — ядро.

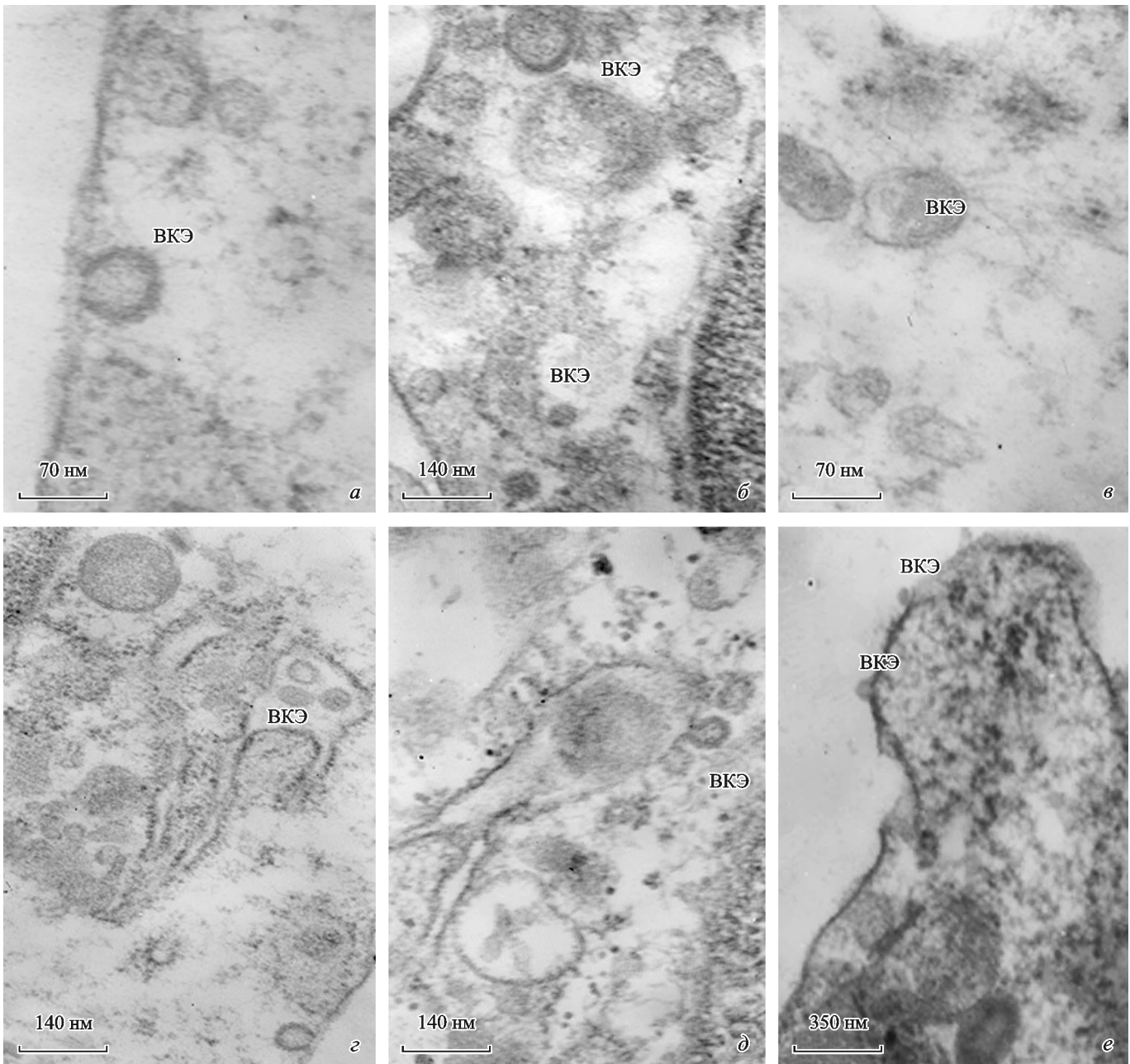


Рис. 3. Основные этапы морфогенеза вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в макрофагах.

*a* — вход вируса в клетку, отмечается утолщение суперкапсид (5 мин инкубации с вирусными частицами); *б* — вирусные частицы в околоядерном пространстве цитоплазмы (30 мин инкубации); *в* — разрежение вирусного нуклеокапсида и образование протениновых нитей на его поверхности (30 мин инкубации); *г* — ВКЭ в цистернах эндоплазматической сети (1.5 ч после заражения); *д* — формирование вирусных частиц на поверхности виропластов (9 ч после заражения); *е* — выход ВКЭ из клетки (2 сут после заражения).

(рис. 1, *ж*), в которых интенсивность флуоресцентного иммуномечения вирусного антигена была максимальной. Необходимо отметить наличие макрофагов с кариорексисом ( $10.0 \pm 1.3\%$ ), а также клеток с 2—3 фрагментами ядра и уменьшенной площадью цитоплазмы ( $5.00 \pm 0.46\%$ ). Подобные изменения клеток являются морфологическими признаками апоптоза. Таким образом, установлено, что ВКЭ проникает в макрофаги, способен в них размножаться и обладает выраженным цитопатогенным действием.

Под хорошо заметной клеточной мембраной у интактных перитонеальных макрофагов находятся мелкие гранулы и отдельные фибриллы (рис. 2). Большинство

гранул, очевидно, являются лизосомами, по периферии которых видны однослойная мембрана и электронно-светлая зона, прилегающая к ней. Центральная часть лизосом представлена гранулярной электронно-плотной субстанцией. Мембранные системы макрофагов хорошо развиты и представлены гранулярным и агранулярным эндоплазматическим ретикулумом, комплексом Гольджи и другими органеллами. Рядом с эндоплазматической сетью располагается комплекс Гольджи, представленный плоскими цистернами и мелкими пузырьками. Свободные гранулы рибонуклеопротеидов рассеяны по всей цитоплазме, в более крупных макрофагах они часто агрегируют в полисомы.

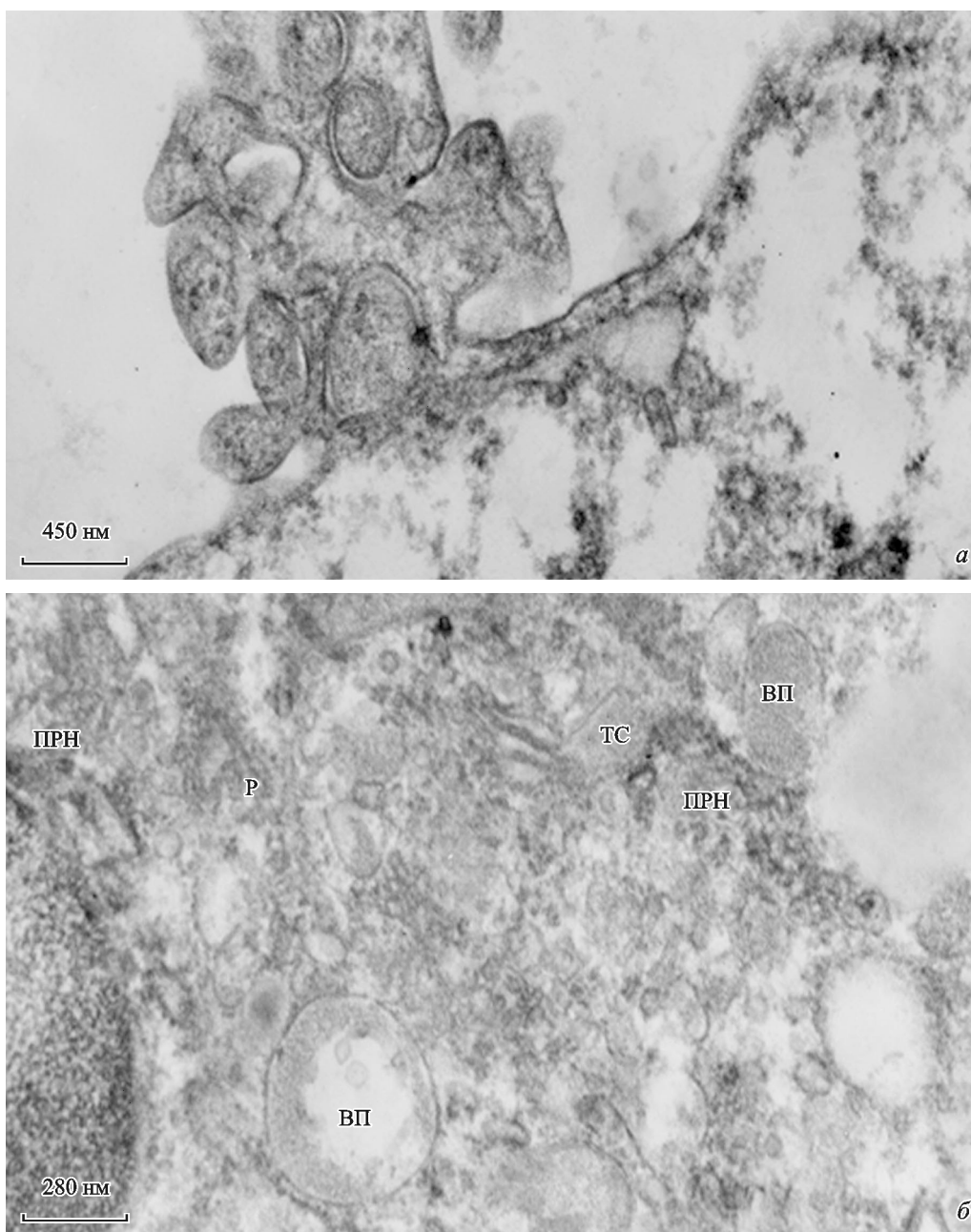


Рис. 4. Ультраструктура макрофагов, зараженных ВКЭ.

*a* — псевдоподии на поверхности клеток (5 ч инкубации с ВКЭ); *б* — локализация клеточных органелл в околоядерном пространстве, отмечается скопление рибосом (Р), трубчатых структур (ТС), полирибосомных нитей (ПРН) и виропластов (ВП) (9 ч инкубации).

Ультраструктурное исследование показало, что в течение первых 5 мин контакта вирус проникает в цитоплазму макрофагов путем локального лизиса плазмалеммы (рис. 3, *a*). При пересечении плазмалеммы клетки происходит разрыхление суперкапсида вирусных частиц, которое морфологически проявляется в увеличении его толщины (рис. 3, *a*). Через 30 мин контакта свободно лежащие вирусные частицы обнаруживали в околоядерном пространстве цитоплазмы (рис. 3, *б*). Там же наблюдали морфологические признаки депротенинизации вирусного генома (4—7 ч инкубации), а именно увеличение размеров вирусных частиц за счет разрежения нуклеокапсида, истончение его оболочки и появление на ее поверхности микрофибрилл (рис. 3, *в*). При этом на препаратах клеток,

находившихся в контакте с вирусом в течение 4—7 ч, при использовании нМФА отмечалось минимальное количество антигенсодержащих клеток. Наряду с локализацией в околоядерном пространстве вирусные частицы в небольшом количестве наблюдали в цистернах гранулярной эндоплазматической сети (рис. 3, *в*). Формирующиеся вирусные нуклеокапсиды обнаруживали в виропластах и на их поверхности после 9 ч инкубации (рис. 3, *з*), причем на поверхности нуклеокапсида была видна двухслойная оболочка, на которой отмечали фибриллярные структуры, имеющие с ней морфологическую связь. Выход отдельных, сформированных вирионов во внеклеточное пространство осуществлялся подобно входу — путем локального лизиса плазмалеммы макрофагов, через 1 сут

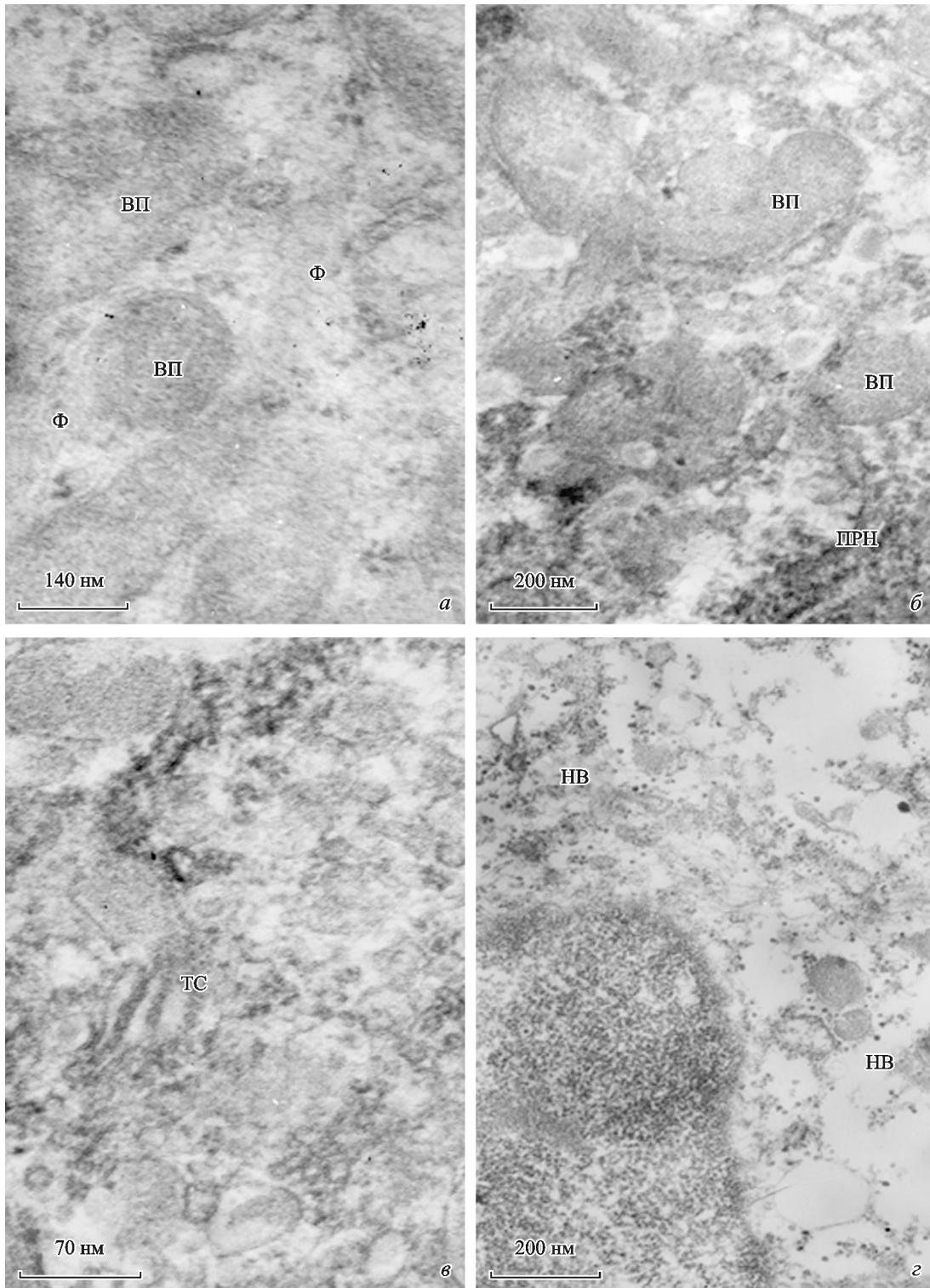


Рис. 5. Вирусиндуцированные структуры в цитоплазме макрофагов через 9 ч после заражения.

*a* — фибриллярные компоненты (Ф) на поверхности плотных виропластов (ВП); *б* — структуризация внутреннего содержимого виропластов, полирибосомные нити (ПРН) в цитоплазме; *в* — трубчатые структуры (ТС); *г* — деструктуризация ядерной оболочки и образование нуклеокапсидов ВКЭ (НВ).

после инфицирования (рис. 3, *e*). Эти данные были подтверждены с помощью метода титрования вируса на перевиваемой культуре клеток. В этот срок в надосадочной жидкости отмечали повышение титра вируса.

Необходимо отметить морфологические изменения плазмалеммы макрофагов, демонстрирующие наличие

специфической стимуляции в ответ на внедрение ВКЭ после 5 ч инкубации. На это указывало появление многочисленных псевдоподий округлой формы (рис. 4, *a*). Одновременно наблюдали уплотнение околоядерного пространства цитоплазмы клеток, в котором отмечалось большое количество рибосом, микрофиламентов, рибо-

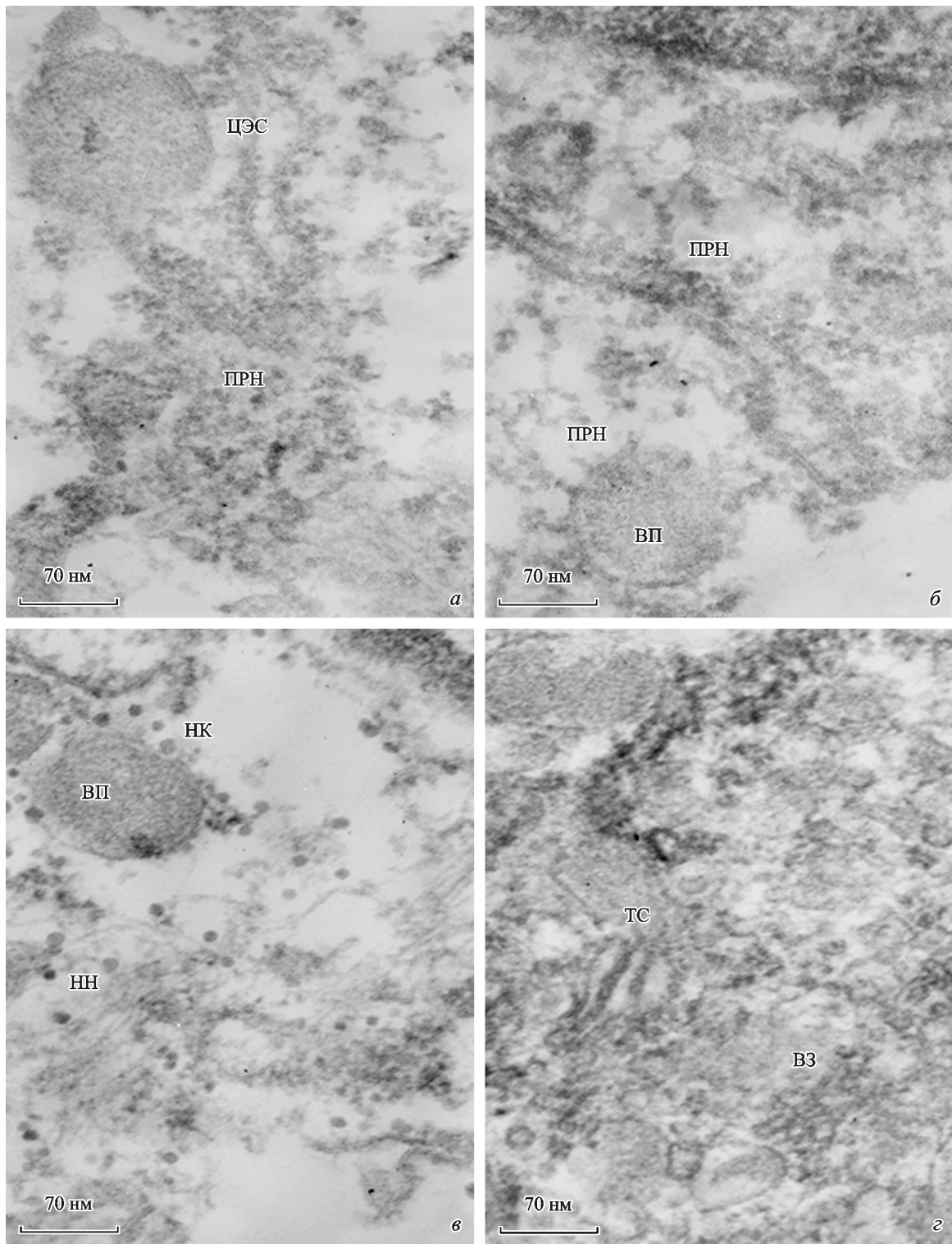


Рис. 6. Вирусиндуцированные структуры в цитоплазме макрофагов через 18 ч после заражения.

*а* — цистерны эндоплазматической сети (ЦЭС) и комплексы полирибосомных нитей (ПРН); *б* — виропласт (ВП) и полирибосомные нити на его поверхности; *в* — нуклеокапсиды на поверхности виропластов, нуклеопротеиновые нити (НН) в цитоплазме; *г* — скопление везикул (ВЗ) и трубчатые структуры (ТС) в цитоплазме (18 ч инкубации).

нуклеопротеидных нитей, различных цитоплазматических включений и вирусоспецифических структур — виропластов (рис. 4, б). Подобные патологические изменения представляют собой признаки зернистой дистрофии клеток, которая обычно сопровождается появлением большого числа различных по длине рибонуклеиновых ни-

тей, разрушенных микрофибрилл и чрезмерного количества рибосом. Помимо длинных фибриллярных структур около виропластов и вирусных частиц в цитоплазме обнаруживали рибонуклеопротеидные нити с утолщением на их конце, которые имели непосредственную морфологически обозначенную связь с рибосомами клетки и

преимущественно локализовались в околядерном пространстве.

Формирование вирусиндуцированных структур — виропластов — с разреженным содержимым и нечетко выраженной оболочкой отмечали после 1 ч инкубации зараженных ВКЭ макрофагов (рис. 5, а). Виропласты, как правило, обнаруживали в окружении рибонуклеопротеидных и полирибосомальных нитей. В дальнейшем (через 3—5 ч) наблюдали структуризацию внутреннего содержимого виропластов и формирование ограничивающей двухслойной мембраны (рис. 5, б). Также в околядерном пространстве цитоплазмы обнаруживали скопление цитоплазматических микротрубочек, классифицированных как трубчатые структуры, на концах которых отмечалось формирование везикул (рис. 5, в). Согласно литературным данным, появление подобных структур и везикул связано с формированием суперкапсидных оболочек вирусов (Offerdahl et al., 2012). После 9 ч инкубации на поверхности мембран виропластов выявляли синтезированные вирионы (рис. 3, д).

Необходимо отметить, что помимо виропластов и трубчатых структур в околядерном пространстве зараженных ВКЭ макрофагов отмечали формирование и других вирусиндуцированных структур. К ним относились тяжи полирибосомальных нитей, входящие в состав цитоплазматических включений (рис. 6, а, б), где наблюдали большое количество нуклеокапсидов ВКЭ (рис. 6, в). Также обнаруживали гладкоконтурные везикулы различной формы, которые преимущественно локализовались около трубчатых структур (рис. 6, з).

Несмотря на наличие признаков активизации синтетических процессов в цитоплазме зараженных ВКЭ макрофагов, подтвержденной с помощью биохимических методов (Plekhoa et al., 2010), нами не обнаружено вирусных частиц и морфологических изменений в ядре клеток на протяжении всего наблюдаемого времени. Иногда в отдельных макрофагах после 9 ч инкубации выявляли нарушение целостности ядерной оболочки, а в околядерной зоне обнаруживали формирование скоплений рибонуклеопротеидных нитей и расширенных цистерн эндоплазматической сети с электронно-плотным содержимым (рис. 4, з; 5, б).

С течением времени (2 сут) в макрофагах появлялись признаки дезорганизации цитоплазмы. Так, при наблюдаемой дислокации клеточных органелл и вирусоподобных частиц в перинуклеарном пространстве макрофагов, а также появлении в этой области полирибосом, виропластов, микрофиламентов и других структур отмечали формирование многочисленных больших вакуолей в периферической части цитоплазмы. Иногда в таких клетках обнаруживали аутофагосомальные вакуоли, мембраны которых ограничивали поврежденные участки цитоплазмы клеток.

## Обсуждение

Патологические процессы, развивающиеся в клетках под влиянием вирусов, принципиально отличаются от других форм клеточной патологии. В таких клетках происходит не только деструкция или гипертрофия отдельных органелл, но и формирование новых структур, которые обеспечивают репликацию вируса, транспорт его отдельных компонентов и выделение из клеток новой популяции вирусов (Chaturvedi, 2006; Ahantari et al.,

2009; Wei et al., 2013; Richard et al., 2015). Причем подвергающиеся деструкции органеллы нередко связаны с вновь формирующимися, что индуцирует изменения в гомо- и гетерологичных органеллах (Offerdahl et al., 2012). В течение некоторого периода времени инфицированные вирусом клетки могут оставаться жизнеспособными и не иметь внешних проявлений цитопатических изменений, однако при необратимости процессов, вызванных инфицированием, такая клетка гибнет. В наших исследованиях в качестве модельной системы была использована первичная культура макрофагов перитонеального экссудата мышей без применения каких-либо индукторов воспаления. Подобная модель для исследования взаимоотношений резидентных макрофагов с вирусами позволяет провести детальное изучение изменений инфицированных клеток с первых минут контакта до окончательных этапов развития инфекции.

Макрофаги являются клетками-эффекторами и модуляторами различных воспалительных процессов, и по данным многих исследователей, вирулицидные свойства этих фагоцитов относятся к важным элементам резистентности организма (Ye et al., 2013; Bardina et al., 2015; McCausland et al., 2015), также показана роль этих клеток в качестве переносчиков вируса (Yokota et al., 2010; Jain et al., 2014). Данные, полученные нами с помощью нМФА, позволяют утверждать, что при невосприимчивости организма к инфекции (у взрослых мышей не наблюдается клинических проявлений клещевого энцефалита) (Maximova et al., 2008), его отдельные клеточные компоненты, а именно макрофаги, могут быть чувствительны к вирусному инфицированию.

Нуклеокапсид ВКЭ покрыт двухслойным липидным суперкапсидом, на котором локализованы молекулы Е-белка, обеспечивающие связывание вируса с рецепторами клеточной мембраны. На начальном этапе адгезии вирусных частиц к поверхности макрофагов нами была обнаружена активация поверхностных белков суперкапсида, которая морфологически проявлялась в утолщении оболочек вирусов и наличии на его поверхности blebs-структур. Подобные структуры были описаны как показатели активации поверхностного белка суперкапсида — гемагглютинина у вируса инфлюэнцы (Wilson et al., 2015). Для флавивирусов Денге и Западного Нила описано проникновение возбудителя в клетки путем клатринзависимого эндоцитоза без формирования ранних и поздних эндосом, при условии использования вирусами клеточных органелл с низким значением pH (Chu et al., 2006; Acosta et al., 2008). Нами было обнаружено, что проникновение ВКЭ в макрофаги происходит путем локального лизиса плазмалеммы. В частности, не было отмечено характерной для формирования эндосом инвагинации плазмалеммы фагоцитов и образования морфологических структур, подобных кавеолам. Показано, что подобным образом флавивирус Денге выходит из макропиноцитозной вакуоли в цитоплазму моноцитов (Acosta et al., 2008).

До проникновения вируса в клетку вирион биологически инертен и его репродуктивная активность проявляется синтезом вирусоспецифических белков, способных в той или иной степени подавлять клеточный метаболизм, что в конечном итоге вызывает гибель клетки-хозяина. Имеются данные об индуцированном флавивирусом Денге апоптозе моноцитов с характерной конденсацией хроматина вдоль внутренней ядерной мембраны, последующей ядерной фрагментацией и уменьшением размеров



клеток (Sun, Kochel, 2013). Эти данные дали авторам основание считать, что роль моноцитов в патогенезе заболевания, вызванного вирусом Денге, ограничена элиминацией вирусных частиц и фагоцитированием остатков клеток, погибших в результате апоптоза, индуцированного вирусом. Однако по данным других исследователей, иммунные гемопоэтические клетки CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup> являются основными источниками репликации вируса (Flipse et al., 2016a). Также отмечалось, что размножение вирусов сосредоточено преимущественно в макрофагах, имеющих четкие признаки функциональной активности с формированием виропластов и нуклеокапсидов (Sun, Kochel, 2012; Tsai et al., 2012; Flipse et al., 2016b). В наших исследованиях использовалась первичная культура макрофагов, которую предварительно инкубировали в течение 3 сут, что позволило получить однородную популяцию клеток, прошедших все этапы дифференцировки. Подготовленные таким образом макрофаги были способны поддерживать репродукцию ВКЭ при сохранении клеточных структур в течение 3 сут, что позволило нам исследовать все этапы морфогенеза этого вируса.

Флавивирусы являются типичными цитозольными вирусами, поскольку их РНК-зависимый полимеразный комплекс ассоциирован с внутриклеточными мембранами. Так, репликационный цикл вируса Западного Нила начинается в цитоплазме клеток с трансляции вирусной РНК и формирования рядом с дочерней РНК полипротеиновых нитей, связанных с мембранными структурами (Klema et al., 2015). Эти структуры морфологически являются как плотное скопление везикул в виде свернутых мембран и паракристаллических структур и включают в себя компоненты вирусоспецифических протеаз. Синтез гликопротеинов суперкапсида происходит в цистернах эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, а сборка вирионов — в расширенных цистернах эндоплазматической сети, где обнаруживаются цепочки новообразованных вирусных частиц (Mackenzie et al., 2007). Подобный репликационный цикл был описан в клетках культуры нейронального происхождения для вируса японского энцефалита (Wang et al., 1997) и для ВКЭ в клетках почек хомяка ВНК-21 (Yoshii et al., 2004). На поздних стадиях развития флавивирусной инфекции комплекс Гольджи перемещается из центральной околядерной зоны в периферическую и входит в состав вирусных включений. В этот момент параллельных цистерн аппарата Гольджи обнаружить не удается, остается только скопление гигантских вакуолей (Mackenzie et al., 2007).

Проведенный нами ультраструктурный анализ макрофагов, зараженных ВКЭ, выявил морфологические особенности, связанные с синтезом вирусных компонентов в цитоплазме, отличающие их от клеток других типов, описанных выше. Несмотря на выявление ВКЭ в цистернах эндоплазматической сети, ни в одном случае нами не было обнаружено признаков синтеза вирусных частиц в этих структурах. Преимущественно новосинтезированные вирусные частицы обнаруживали свободными в цитоплазме клеток, со временем они перемещались в околядерную зону, где наблюдались морфологические признаки активации процесса депротенинизации вирусного генома. На поверхности вирионов визуализировались нитевидные структуры, отмечались разрежение нуклеокапсида и повреждение его оболочки. Затем обнаруживалось формирование вирусоспецифических и вирусиндуцированных структур в цитоплазме, где осуществ-

лялся синтез нуклеиновых и белковых компонентов ВКЭ. На поверхности виропластов выявляли новообразованные вирусные частицы. Помимо этого, после инкубации в течение 24 ч в околядерной зоне цитоплазмы обнаруживали интенсивное формирование нуклеокапсидов ВКЭ, которые морфологически были связаны с полипротеиновыми нитями. Вероятно, последние являются белковыми компонентами суперкапсида ВКЭ. Мы не наблюдали гексагональных упаковок и цепочек новообразованных вирусных частиц, формирующихся при размножении флавивирусов в нейронах (Maximova et al., 2008). По-видимому, это обусловлено структурными отличиями макрофагов от нейронов, а именно меньшей площадью ядра и цитоплазмы, наличием менее развитой и четко структурированной эндоплазматической сети, а также меньшим количеством митохондрий.

Защитная реакция макрофагов, инфицированных ВКЭ, выражалась в виде формирования в их цитоплазме фагосомоподобных везикул, которые можно отнести к аутофагирующим структурам, образующимся в результате синтеза мембран *de novo* вокруг поврежденного участка цитоплазмы клетки. С течением времени в макрофагах появлялись фагосомоподобные вакуоли, содержавшие вирусные частицы, и обнаруживалось слияние мембрано-содержащих органелл клетки. Выход ВКЭ осуществлялся за счет тех же механизмов, что и их проникновение в клетку, а именно путем локального лизиса плазмалеммы. Подобный способ выхода из макрофагов был описан для вируса иммунодефицита (Mlcochova et al., 2013; Nkwe et al., 2016). Свойство группы вирусов, содержащих суперкапсид, проникать в клетки-мишени и покидать их, не разрушая ее плазмалеммы, определяет их способность к длительной репродукции в макрофагах без цитопатического эффекта.

Таким образом, в настоящей работе с помощью вирусологических и морфологических методов установлено, что ВКЭ из вирусосодержащей жидкости способен адгезировать к плазмалемме макрофагов, проникать и размножаться в этих клетках. При этом ВКЭ активирует свой геном в цитоплазме, не затрагивая клеточного ядра, поэтому инфицирование макрофагов ВКЭ следует отнести к автономному типу. Развитие в клетке острой литической продуктивной инфекции обуславливается появлением в процессе репродукции полноценных вирусов, что подтверждено с помощью метода титрования на перевиваемой культуре клеток СПЭВ, а также вирусоспецифических и вирусиндуцированных образований, которые за счет токсических и механических воздействий на клетку вызывают ее гибель. ВКЭ как «одетый» вирус характеризуется способностью проникать в клетку, не нарушая плазмалеммы. При отсутствии выраженных деструктивных изменений макрофаги могут выступать в роли источника ВКЭ и принимать определенное участие в процессе его диссеминации в организме.

В результате проведенных нами ультраструктурных исследований можно выделить следующие морфологические отличимые этапы репродукции ВКЭ в цитоплазме резидентных макрофагов. Из проникших в клетку вирусных частиц формируются виропласты. Около них происходит образование различных вирусиндуцированных структур: полирибосомных и рибонуклеопротеидных нитей и гладкоконтурных вакуолей, которые образуются из трубчатых структур и являются первичными оболочками вируса. Таким образом, в цитоплазме резидентных макрофагов ВКЭ формирует определенные зоны синтеза своих компонентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-33-00009) и Федерального агентства научных организаций.

### Список литературы

- Леонова Г. Н., Тимофеев И. В., Орлова Т. Г. 1991. Репродукция вируса клещевого энцефалита в лейкоцитах человека. *Вопр. вирусол.* 1 : 61—63. (Leonova G. N., Timofeev I. V., Orlova T. G. 1991. Reproduction of borne encephalitis virus in human leukocytes. *Issues Virusol.* 1 : 61—63.)
- Пирогова Н. П., Новитский В. В., Карпова М. Р., Рязанцева Н. В., Мельникова А. П., Михайлова О. В., Бузов О. В. 2003. Особенности фагоцитарной активности лейкоцитов в периферической крови у больных клещевым энцефалитом. *Бюл. эксперим. биол. мед. Прил.* 1 : 82—85. (Pirogova N. P., Novitskii V. V., Karpova M. R., Ryazantseva N. V., Mel'nikova A. P., Mikhailova O. V., Burov O. V. 2003. Phagocytic functions of the blood in patients with acute tick-borne encephalitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 135 (1) : 70—72.)
- Плехова Н. Г., Сомова Л. М. 2010. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций. *Тихоокеан. мед. журн.* 3 (41) : 5—10. (Plekhova N. G., Somova L. M. 2010. The role of monocytes/macrophages in pathogenesis of viral infection. *Pacific Med. J.* 3 (41) : 5—10.)
- Acosta E. G. V., Castilla E. B., Damonte A. 2008. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 89 : 474—484.
- Ahantarig A., Růžek D., Vancová M., Janowitz A., St'astrná H., Tesarová M., Grubhoffer L. 2009. Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology.* 52 : 283—290.
- Baral P., Batra S., Zemans R. L., Downey G. P., Jeyaseelan S. 2014. Divergent functions of Toll-like receptors during bacterial lung infections. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 : 722—732.
- Bardina S. V., Michlmayr D., Hoffman K. W., Obara C. J., Sum J., Charo I. F., Lu W., Pletnev A. G., Lim J. K. 2015. Differential roles of chemokines CCL2 and CCL7 in monocytoysis and leukocyte migration during West Nile virus infection. *J. Immunol.* 195 : 4306—4318.
- Carty M., Reinert L., Paludan S. R., Bowie A. G. 2014. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends Immunol.* 35 : 79—87.
- Chaturvedi U. C., Nagar R., Shrivastava R. 2006. Macrophage & Dengue virus: friend or foe? *Indian J. Med. Res.* 124 : 23—40.
- Chen Y.-C., Wang S.-Y. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by Dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J. Virol.* 76 : 9877—9887.
- Chu J. J., Leong P. W., Ng M. L. 2006. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology.* 349 : 463—475.
- Flipse J., Dioso-Toro M. A., Hoornweg T. E., van de Pol D. P., Urcuqui-Inchima S., Smit J. M. 2016a. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in primary human macrophages; balancing higher fusion against antiviral responses. *Sci. Rep.* 6 : 29 201—29 209.
- Flipse J., Torres S., Dioso-Toro M., van der Ende-Metseelaar H., Herrera-Rodriguez J., Urcuqui-Inchima S., Huckriede A., Rodenhuis-Zybert I. A., Smit J. M. 2016b. Dengue tropism for macrophages and dendritic cells: the host cell effect. *J. Gen. Virol.* 97 : 1531—1536.
- Frischknecht F. 2007. The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell. Microbiol.* 9 : 1630—1640.
- Geissmann F., Manz M. G., Jung S., Sieweke M. H., Merad M., Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 327 : 656—661.
- Hume D. A. 2012. Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. *J. Leuk. Biol.* 92 : 433—444.
- Hume D. A. 2015. The many alternative faces of macrophage activation. *Front Immunol.* 6 : 370—380.
- Jain B., Chaturvedi U. C., Jain A. 2014. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; an overview. *Microb Pathog.* 69—70 : 45—52.
- Jiang R., Ye J., Zhu B., Song Y., Chen H., Cao S. 2014. Roles of TLR3 and RIG-I in mediating the inflammatory response in mouse microglia following Japanese encephalitis virus infection. *J. Immunol. Res.* 2014 : 787023.
- Klema V. J., Padmanabhan R., Choi K. H. 2015. Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses.* 7 : 4640—4656.
- Krylova N. V., Smolina T. P., Leonova G. N. 2015. Molecular mechanisms of interaction between human immune cells and Far Eastern Tick-Borne encephalitis virus strains. *Viral. Immunol.* 28 : 272—281.
- Kumar M., Roe K., O'Connell M., Nerurkar V. R. 2015. Induction of virus-specific effector immune cell response limits virus replication and severe disease in mice infected with non-lethal West Nile virus Egl01 strain. *J. Neuroinflamm.* 12 : 178—184.
- Mackenzie J. M., Kenney M. T., Westaway E. G. 2007. West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis. *J. Gen Virol.* 88 (Pt 4) : 1163—1168.
- Martinez F. O., Helming L., Gordon S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27 : 451—483.
- Maximova O. A., Ward J. M., Asher D. M., St Claire M., Finneyfrock B. W., Speicher J. M., Murphy B. R., Pletnev A. G. 2008. Comparative neuropathogenesis and neurovirulence of attenuated flaviviruses in nonhuman primates. *J. Virol.* 82 : 5255—5268.
- McCausland M. R., Juchnowski S. M., Zidar D. A., Kuritzkes D. R., Andrade A., Sieg S. F., Lederman M. M., Funderburg N. T. 2015. Altered monocyte phenotype in HIV-1 infection tends to normalize with integrase-inhibitor-based antiretroviral therapy. *PLoS ONE.* 10 : e0139474.
- Mlcochova P., Pelchen-Matthews A., Marsh M. 2013. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol.* 11 : 89—99.
- Moniuszko A., Pancewicz S., Czupryna P., Grygorczuk S., Świerżbińska R., Kondrusik M., Penza P., Zajkowska J. 2012. ssI-CAM-1, IL-21 and IL-23 in patients with tick borne encephalitis and neuroborreliosis. *Cytokine.* 60 : 468—472.
- Nkwe D. O., Pelchen-Matthews A., Burden J. J., Collinson L. M., Marsh M. 2016. The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages. *BMC Biol.* 14 : 50—68.
- Offerdahl D. K., Dorward D. W., Hansen B. T., Bloom M. E. 2012. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. *PLoS ONE.* 7 : e47912.
- Plekhova N. G., Somova L. M., Krylova N. V., Leonova G. N., Lyapun I. N., Smirnov I. S. 2013. Biochemical markers of virus cytopathogenicity in macrophages. *Appl. Biochem. Microbiol.* 49 : 64—73.
- Richard A. S., Zhang A., Park S.-J., Farzan M., Zong M., Choe H. 2015. Virion-associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112 : 14 682—14 687.
- Schmidt S., Moser M., Sperandio M. 2013. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol. Immunol.* 55 : 49—58.
- Sun P., Kochel T. J. 2013. The battle between infection and host immune responses of Dengue virus and its implication in Dengue disease pathogenesis. *Sci. World J.* 843469.
- Takeuchi O., Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140 : 805—820.

Tsai J. J., Liu L. T., Chang K., Wang S. H., Hsiao H. M., Clark K. B., Perng G. C. 2012. The importance of hematopoietic progenitor cells in dengue. *Ther. Adv. Hematol.* 3 : 59—71.

Uehara E. U., Shida Bde S., de Brito C. A. 2015. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. *Inflamm. Res.* 64 : 845—852.

Wang J. J., Liao C. L., Chiou Y. W., Chiou C. T., Huang Y. L., Chen L. K. 1997. Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus. *Virology.* 238 : 30—39.

Wei J., Kang X., Li Y., Wu X., Zhang Y., Yang Y. 2013. Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus to monocytes. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 53 : 1221—1225.

Wilson R. L., Frisz J. F., Klitzing H. A., Zimmerberg J., Weber P. K., Kraft M. L. 2015. Hemagglutinin clusters in the plasma membrane are not enriched with cholesterol and sphingolipids. *Biophys. J.* 108 : 1652—1659.

Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker. Res.* 2 : 1—18.

Ye J., Zhu B., Fu Z. F., Chen H., Cao S. 2013. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine.* 31 : 461—471.

Yokota S., Okabayashi T., Fujii N. 2010. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. *Mediators Inflamm.* 2010 : 184328.

Yoshii K., Konno A., Goto A., Nio J., Obara M., Ueki T., Haya-saka D., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. 2004. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 10) : 3049—3058.

Поступила 22 IX 2016

#### THE STRUCTURAL CHANGES OF MACROPHAGES INFECTED WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

N. G. Plekhova,<sup>1,\*</sup> E. V. Pustovalov,<sup>2</sup> L. M. Somova,<sup>3</sup> G. N. Leonova,<sup>3</sup> E. I. Drobot,<sup>3</sup> I. N. Lyapun<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pacific State Medical University, Central Science Laboratory, Vladivostok, 690002,

<sup>2</sup> Far Eastern Federal University, School of Biomedical, Vladivostok, 690950, and

<sup>3</sup> G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087;

\* e-mail: pl\_nat@hotmail.com

Macrophages belong to the innate immune cells and play a key role in the pathogenesis of viral infections. The results of ultrastructural study of macrophages infected with tick-borne encephalitis virus (TBEV), the *Flavivirus* family, pathogens of human infections, affecting the nervous system, were presented. With the assistance of virological methods was found that the TBEV are absorbed by macrophages and replication in them. An ultrastructural study has shown that the virus enters into the cytoplasm by local destruction of plasmalemma and newly synthesized virus particles exited from the cell by same. Simultaneously there is a seal of perinuclear cytoplasm space, where found in a large number of ribosomes, microfilaments, ribonucleoprotein fibers and viral special structure: nucleocapsids, tubular formations and viral layers (fabrics). On the surface of last structures the newly synthesized virus particles were visualized. Thus, the evidence shows that macrophages play a role in the spread of TBEV, being for their the target cell. As active antigen presenting cells the macrophages can modulate the protective response of the body and influence on the pathogenesis of tick-borne encephalitis.

Key words: Tick-borne encephalitis virus, macrophages, ultrastructure, morphogenesis, flaviviruses.