

3D structure of which is freely available in the ProteinDataBank under the code 4MT2. The comparison between complexes Zn7-MT, Cd7-MT, Hg7-MT demonstrates their structural proximity, in the presence of areas, in which there are significant differences that probably might be fundamental for the intracellular recognition and transportation of differently loaded complexes into the appropriate

compartments for the excretion (in case of toxic metals) and usage (in case of Zinc).

**Keywords:** *metallothionein, zinc, cadmium, mercury, modeling of the structure of the complex, semi-empirical quantum-chemical program Molecular Orbital PACkage MOPAC®*

*Впервые поступила в редакцию 03.02.2014 г.  
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 616.921.5+502.085

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА С ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК

**Дивоча В.А.**

*Украинский НИИ медицины транспорта, г. Одесса; divocha09@ukr.net*

В данной работе было изучено взаимодействие вирусов парагриппа с первично-трипсинизированными культурами клеток почек эмбриона человека. Установлено, что инфекционный вирус парагриппа образуется раньше агглютинирующего антигена. Цитоморфологическими методами установлено, что поражение ядер и цитоплазмы в инфицированной клетке происходит одновременно. Отличительным тестом для парагриппозных инфекций является образование цитоплазматических включений и симпластов. Морфологический метод более чувствителен по сравнению с реакциями гемадсорбции и агглютинации, так как уже через 24 часа после заражения выявлены изменения в клетке.

**Ключевые слова:** *парагрипп, клетки почек эмбриона человека, вирусы.*

### Введение

До настоящего времени специфического антивирусного лечения парагриппозных заболеваний нет [1, 2]. Сейчас самым эффективным средством лечения парагриппозной инфекции являются интерфероны и их блокаторы [3, 4]. Основным путем получения эффективных препаратов против парагриппа является изготовление специфических иммуноглобулинов. Но для получения специфических препаратов вначале надо получить высокоиммунизирующие антигены.

Поэтому целью данного исследования было изучение образования инфекционного вируса и гемагглютинирующего антигена вирусов парагриппа с параллельным их цитоморфологическим изучением.

### Материалы и методы

В работе использовались первичные клетки почек эмбриона человека 5-6 месяцев, и вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (ПГ1 – СС 1889, ПГ2 – 931, ПГ3 – 932, ПГ4В – 15429). Трипсинизация почек эмбриона человека (ПЭЧ) проводилась по модифицированному методу, предложенному А.М. Трубиной и соавт. [5]. Заражение клеток ПЭЧ вирусами парагриппа 1, 2, 3 и 4-го типов осуществляли на 5-е сутки роста ткани. В этих опытах параллельно изучалось появление и накопление инфекционного вируса, гемагглютинирующего антигена и цитоморфологические изменения.

Для определения инфекционности вирусов парагриппа использовалась реакция гемадсорбции [6]. Реакция гемад-

глютинации (РГА) ставили с 0,5 % эритроцитами морских свинок по общепринятой методике. Цитоморфологические исследования проводили через 24 часа после заражения и каждый последующий день до 9-ти суток, препараты фиксировались в растворе Буэна и окрашивались гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты просматривались под микроскопом МБИ-6, фотографирование проведено на пленку «Микрат-300».

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований, представленных в таблице, показали, что положительная гемадсорбция обнаруживалась только на 6-е сутки после заражения и исчезала на 9-е сутки. Появление гемагглютининов в вирусосодержащей жидкости отмечено на 7-е сутки после заражения в титре 1:2. Максимальное накопление гемагглютининов в вирусосодержащей жидкости наблюдалось на 9-е сутки (в титре 1:8), в то время как реакция гемадсорбции уже отсутствовала.

Таким образом, инфекционный вирус образовывался раньше, чем агглютинирующий антиген.

При цитоморфологическом изучении установлено, в норме клетки почки эмбриона человека (ПЭЧ) веретенообразной формы, ядро овальной или округлой формы, имеет от 2 до 6 ядрышек (рис. 1).

Для наиболее ранних стадий поражения характерно уплотнения хроматина, концентрация его в центре ядра, ядро приобретает неправильную форму, клетка обособливается.

Образуется 2-х и 3-х ядерные клетки, но они всегда имели уже измененные ядра. В дальнейшем ядро уменьшается в размере, отодвигается

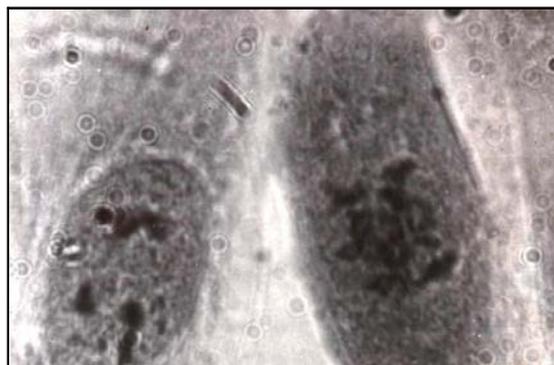


Рис. 1. Нормальные клетки почки эмбриона человека на пятые сутки роста.

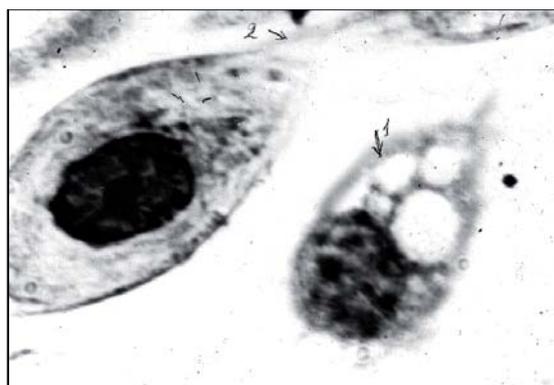


Рис. 2. Клетки почки эмбриона человека через 24 часа после заражения вирусом парагриппа. 1. Вакуолизация цитоплазмы. 2. Цитоплазматический отросток.

к периферии, приобретает вначале бобовидную форму, а в дальнейшем сморщивается (рис. 2.)

К 24 часам после заражения на монослое было отмечено много клеток резко эозинофильных с измененными ядрами.

В цитоплазме на начальных фазах отмечена вакуолизация цитоплазмы (рис. 2).

Таблица

Сравнительная характеристика взаимодействия вирусов ПГ1-4 типов с первичными клетками ПЭЧ

№ п/п	Тип вируса парагриппа	Гемадсорбция (инфекционный вирус)					РГА (агглютинирующий)				
		1-5	6	7	8	9	1-5	6	7	8	9
1.	ПГ1 — К	0	+++	++	++	0	0	0	1:2	1:4	1:8
2.	ПГ2 — К	0	+++	+++	++	0	0	0	1:2	1:4	-
3.	ПГ3 — К	0	+++	++	+	0	0	0	1:2	1:8	1:8
4.	ПГ4 — К	0	+++	+++	++	0	0	0	1:2	1:4	1:8
5.	К.Т.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

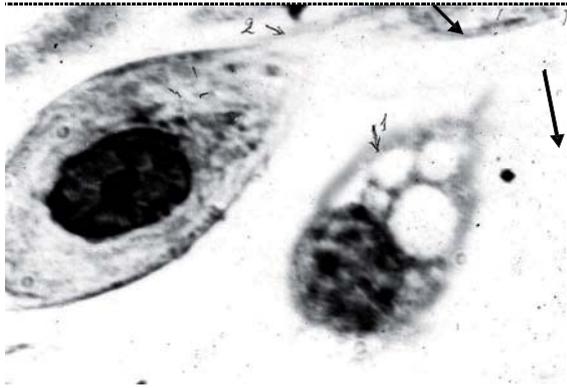


Рис. 2. Клетки почки эмбриона человека через 24 часа после заражения вирусом парагриппа.

1. Вакуолизация цитоплазмы.
2. Цитоплазматический отросток.



Рис. 3. Резко эозинофильные включения, окруженные светлым ободком через 24 часа после заражения вирусом парагриппа-3 клеток ПЭЧ.

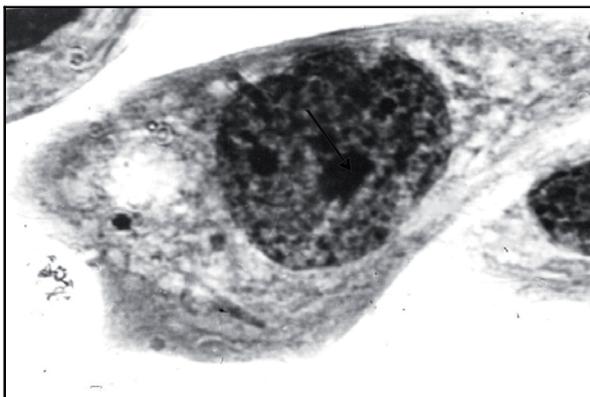


Рис. 4. Эозинофильные уплотнения в цитоплазме через 24 часа после заражения. Светлые включения округлой формы всегда расположены возле ядра и не отделяются от цитоплазмы.

В дальнейшем клетка становилась компактной, резко эозинофильной и содержала по 1-2 цитоплазматических отростка, очень длинных в 3-4 раза превышающих размер нормальной клетки. Цитоплазматический отросток на конце имел разветвления от 6-ти до 8-ми и эти разветвления как бы избирательно проникали в здоровую клетку. Под малым увеличением – картина моста над монослоем непораженных клеток.

Уже к 24 часам после заражения в цитоплазме клеток отмечалось наличие 2-х видов включений: одни резко эозинофильные, всегда окружены светлым ободком (рис. 3), вторые – светлые, всегда округлой формы не отделены от цитоплазмы и всегда расположены возле ядра (рис. 4).

В дальнейшем включения вырастают, отодвигают ядро к периферии и как бы передавливают его (рис. 5), потом, по-видимому, включения вылуцчиваются из цитоплазмы, оставляя большие полости (рис. 6).

К 96 часам после заражения были отмечены включения и в делящихся клетках. На 6-е сутки большинство клеток содержало эозинофильные включения. К 7-м суткам отмечены симпласты, содержащие по 5-6 ядер, монослой редет. В слившихся клетках появляются многочисленные мелкие гранулы, что придает им вид губок (рис. 6).

Таким образом, морфологический метод оказался более чувствительным по сравнению с реакцией гемадсорбции и РГА, так как уже через 24 часа выявлены глубокие изменения в клетке под действием вируса ПГ-3.

Решение вопросов, связанных с получением антигенов, требовало детального изучения особенностей взаимоотношений отдельных типов вирусов парагриппа с чувствительными культурами клеток. Положительная реакция гемадсорбции в ткани почек эмбриона человека при заражении парагриппозными вирусами отмечалась раньше появления

гемагглютининов в вирусосодержащей жидкости, что соответствовало данным литературы [7]. Максимальное накопление гемагглютининов наблюдалось в тот период, когда на стекле оставалось очень мало клеток, т.е. в тот период, когда происходило отслоение инфицированных клеток от стекла с выходом вируса из клетки.

При просмотре окрашенных гематоксилин-эозином препаратов цитоморфологические изменения всех этапов репродукции вируса парагриппа отмечены уже через 24 часа после заражения. Характер ранних стадий поражений клетки сходен с ранними стадиями поражения клетки вирусами коксаки В [8-10]. Но образование 2-х и 3-х ядерных клеток и

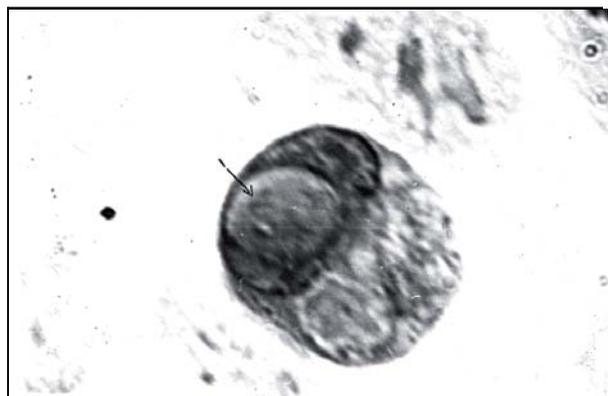


Рис. 5. Клетки ПЭЧ через 7 суток после заражения парагриппом-3 (выросшее включение передававшее ядро).



Рис. 6. Вылущивание вирусных включений из цитоплазмы пораженных клеток через 7 суток после заражения

эозинофильных включений характерно только при парагриппозной инфекции [11]. Было установлено, что пораженные вирусом клетки продуцируют вещество «синцитин», которое способно расплавлять стенки клеток и вызывать сближение ядер [12]. Передача инфекционного вируса из клетки в клетку осуществляется, по-видимому, через цитоплазматические отростки. Нам удавалось отчетливо наблюдать как по отростку перемещается часть пораженной цитоплазмы. Цитоплазматические отростки избирательно проникали в здоровую клетки. К 24 часам после заражения в цитоплазме пораженных клеток обнаруживались включения 2-х видов: первые резко эозинофильные, полиморфные, окруженные светлым ободком, располагаются как по периферии цитоплазмы, так и возле ядра. Их бывает несколько в одной клетке. В то время как другой вид включений, очень плохо окрашиваемый гематоксилин-эозином, поэтому всегда светлый, не отделен от цитоплазмы и расположен в перинуклеарной зоне цитоплазмы. С возрастом включения вырастали, сдавливали ядро и очень трудно различить, что это не ядерное включение, а именно цитоплазматические. Природа включений, вызываемая парагриппозными вирусами, еще мало ясна. По нашим данным на 6-е сутки после заражения большинство клеток содержало эозинофильные включения и в этот период мы отмечали появление положительной реакции гемадсорбции. По-видимому, можно предположить, что включения содержат и вирусный материал.

#### Выводы

1. Инфекционный вирус парагриппа образуется раньше агглютинирующего антигена.
2. Поражение ядер и цитоплазмы в инфицированной клетке происходит одновременно.
3. Морфологическим отличительным тестом для парагриппозных инфекций являются образование цитоп-

лазматических включений и симпластов.

4. Морфологический метод более чувствителен по сравнению с реакциями гемадсорбции и гемагглютинации, т.к. уже через 24 часа после заражения выявлены изменения в клетке.

### Литература

1. Букринский А.Г., Гоженко А.И., Дивоча Д.А. и др. Вирусология. Учебное пособие для медицинских ВУЗов. – Луганск, 2013. – 364 с.
2. Watanabe M., Mishin V.P., Brown S. A. at al. Effect of hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 on grown and pathogenicity of Sendai. Human parainfluenza Type 3 chimera virus in mice // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2009. – V.53, № 9. – P. 3942-3951.
3. Романов М.Г., Сологуб Т.В., Петров А.Ю. и др. Циклоферон в лечении и экстренной профилактики респираторных вирусных инфекций и гриппа // *Клиническая медицина.* – 2011. — № 1. — С.1-4.
4. Кареткина Г.Н. Применение индукторов интерферонов для лечения и профилактики гриппа и других респираторных инфекций // *Лечащий врач.* – 2009. — № 10. — С.1-4.
5. Трубина Л.М., Михова И.А., Мошашвили И.Я. Изобретение SU № 125678. А1 А 61 К 39/00. — Способ получения гриппозного антигенного нейраминидазного эритроцитарного диагностикума. — 15.09.86. Бюл. № 34.
6. Vogel J., Spelokov A. Reports Adsorption-Hemagglutination Test for Influenza Virus in Monkey Kidney Tissue Culture // *Science.* – V. 23. – P. 358-359.
7. Букринская А.Г. Вирусология. Учебное пособие для студентов мед. институтов. – Москва: Медицина, 1986. – 336 с.
8. Дивоча В.А., Стопчанская А.Г., Губенко Т.Л. Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных заболеваний: сб. научн. работ. – Москва, 1972. – С. 532-533.
9. Дивоча В.А., Стопчанская А.Г. Сравнительное изучение чувствительности различных культур клеток к вирусам Коксаки В // *Вирусы и вирусные заболевания: сб. научн. работ.* – Киев: Здоровье, 1972. – Вып. 6 – С. 66-70.
10. Дивоча В.А. Влияние вирусов Коксаки В на процесс клеточного деления // *Вирусы и вирусные заболевания: сб. научн. работ.* – Киев: Здоровье, 1977. – Вып. 4 – С. 103-106.
11. Beale J., McLeod D.L., Stackiw W. at al. Isolation of cytopathogenic agents from the respiratory tract in acute laryngotracheobronchitis // *Br. Med. J.* — 1958. – V. 1(5066). – P. 302-303.
12. Cook M.K., Chanock R.M., Fox H.H. at al. Role of eaton agent in disease of lower respiratory tract // *Br. Med. J.* — 1960. – V. 1(5177). – P. 905-911.

### References

1. Bukrinskay A.G, Gozhenko A.I., Divocha V.A. et al. *Virology // Textbook for medical schools.* — Lugansk, 2013. – 364 p. [Rus]
2. Watanabe M., Mishin V.P., Brown S.A. at al. Effect of hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 on grown and pathogenicity of Sendai. Human parainfluenza Type 3 chimera virus in mice // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2009. – V.53, № 9. – P. 3942-3951.
3. Romanov M.G., Sologub T.V., Petrov A.U. et al. Cycloferon treatment and emergency prevention of respiratory viral infections and influenza // *Clinical Medicine.* — 2011. — № 1. – P. 1-4. [Rus]
4. Karetkina G.N. Application of interferon inducers for the treatment and prevention of influenza and other respiratory infections // *Treating doctor.* — 2009. — № 10. — P.1-4. [Rus]
5. Trubina L.M., Mihova I.A., Moshashvili I.J. The invention SU № 125678. А1 А 61 К 39/00. — A method for producing influenza neuraminidase antigenic erythrocyte diagnosticum. — 09.15.86. Bull. N. 34. [Rus]
6. Vogel J., Spelokov A. Reports Adsorption-Hemagglutination Test for Influenza Virus in Monkey Kidney Tissue Culture // *Science.* – V. 23. – P. 358-359.
7. Bukrinskaya A.G. *Virology // Textbook for medical students.* — Moscow: Medicina, 1986. – 336 p. [Rus]
8. Divocha V.A. Stopchanskaya A.G., Gubenko T.L. Actual problems of virology and prevention of viral diseases: abstract works. — Moscow, 1972. — P. 532-533. [Rus]
9. Divocha V.A. Stopchanskaya A.G. Comparative study of the sensitivity of various cell cultures to Coxsackie B viruses

- // Viruses and viral diseases: Sat Nauchn. work. — Kiev: Health, 1972. — Issue. 6 — P. 66-70. [Rus]
10. Divocha V.A. Coxsackie B viruses impact on the process of cell division // Viruses and viral diseases: Sat Nauchn. work. — Kiev: Health, 1977. — Issue. 4 — P. 103-106. [Rus]
  11. Beale J., McLeod D.L., Stackiw W. at al. Isolation of cytopathogenic agents from the respiratory tract in acute laryngotracheobronchitis // Br. Med. I. — 1958. — V. 1(5066). — P. 302-303.
  12. Cook M.K., Chanock R.M., Fox H.H. at al. Role of eaton agent in disease of lower respiratory tract // Br. Med. I. — 1960. — V. 1(5177). — P. 905-911.

### Резюме

#### ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУСІВ ПАРАГРИПУ З ЧУТЛИВИМИ КУЛЬТУРАМИ КЛІТИН

*Дівоча В.А.*

*Український НДІ медицини транспорту МОЗ, Одеса*

У даній роботі було вивчено взаємодію вірусів парагрипу з первинно-тринсинізованими культурами клітин нирок ембріонів людини (НЕЛ). Встановлено, що інфекційний вірус парагрипу утворювався раніше аглютинуючого антигену. Цитоморфологічними методами встановлено, що поразка ядер та цитоплазми в інфікованій клітині відбувалася одночасно. Відмінним тестом для парагрипозних інфекцій було утворення цитоплазматичних включень та симпластів. Морфологічний метод був більш чутливим порівняно з реакціями гемадсорбції

та аглютинації, тому що вже через 24 години після зараження виявлені зміни в клітині.

**Ключові слова:** парагрип, клітини нирок ембріона людини, віруси.

### Summary

#### RESEARCH OF INTERACTION OF VIRUSES OF PARAINFLUENZA WITH SENSITIVE CELLULAR CULTURES

*Divocha V.A.*

*State Enterprise Ukrainian Research Institute for Medicine of Transport, Odessa*

Interaction of viruses of parainfluenza with primary O-trypsinized cellular cultures of cells of a human embryos' kidneys have been studied. It has been established that the infectious virus of parainfluenza is formed before an agglutinant antigen. By cytomorphological methods it has been established that defeat of nuclei and cytoplasm in the infected cell happens simultaneously. Distinctive test for the parainfluenza infections is formation of cytoplasmatic inclusions and symplasts. The morphological method is more sensitive on as against with the reactions of gemadsorbition and imagglyutination as in 24 hours after infection changes in a cell are revealed.

**Key words:** *parainfluenza, human embryonic kidney cells, viruses.*

*Впервые поступила в редакцию 17.12.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*